

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Απόκριση γονοτύπων μαρουλιού σε καταπόνηση από βαρέα μέταλλα και
ανάπτυξη δεικτών για την επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων

ΛΕΑΝΔΡΟΣ-ΗΛΙΑΣ ΜΑΓΓΙΩΡΟΣ



Επιβλέπουσα: Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια, Π.Θ.

Βόλος 2019

Απόκριση γονοτύπων μαρουλιού σε καταπόνηση από βαρέα μέταλλα
και ανάπτυξη δεικτών για την επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων

Λέανδρος-Ηλίας Μαγγιώρος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παυλή Ουρανία, Επικ. Καθηγήτρια, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χα Ιμπραχίμ- Αβραάμ, Επικ. Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βασίλειος Αντωνιάδης, Αναπλ. Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Εδαφολογία, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Copyright © ΜΑΓΓΙΩΡΟΣ ΛΕΑΝΔΡΟΣ, 2019.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναγράφεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος» του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της σχολής των Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Με την διεκπεραίωση της διατριβής μου θα ήθελα με την σειρά μου να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις θερμές μου ευχαριστίες για όλους όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά, την κ. Παυλή Ουρανία, Επικ, Καθηγήτρια, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, που υπήρξε η επιβλέπουσα της διατριβής μου, για την στήριξή της και το ενδιαφέρον απέναντί μου. Επίσης, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της συγκεκριμένης πειραματικής έρευνας, την απόλυτη βοήθεια, την επιστημονική καθοδήγηση αλλά και την συνεχή μεταλαμπάδευση αστείρευτης γνώσης, την υπομονή αλλά και τις στοχευμένες υποδείξεις της σε όλο ο διάστημα που συνεργαστήκαμε. Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ για όλη την συμβολή της όχι μόνο στο κομμάτι της εργασίας αλλά σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τους καθηγητές, Ιμπραχίμ - Αβραάμ Χα και Αντωνιάδη Βασίλειο για την συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και για τις εποικοδομητικές και στοχευμένες υποδείξεις τους με στόχο την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Την Κ. Άννα , Μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος για την άψογη συνεργασία μας καθώς και για την στήριξή της και την πολύτιμη βοήθεια της σε όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου διαδικασίας, όπως και την Φώτη Χρύσα για την πολύτιμη βοήθειά της.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς τον συμφοιτητή του, συνεργάτη αλλά και πολύτιμό μου φίλο Κεμπαπίδη Κυριάκο για όλη την βοήθεια που μου πρόσφερε, τις γνώσεις αλλά και την στήριξή του για την διεκπαιρέωση αυτής της εργασίας

Τέλος, θερμά ευχαριστώ σε όλη μου την οικογένεια για τα τόσα χρόνια υπομονής, για την στήριξή και κατανόηση που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Τις τελευταίες δεκαετίες, ο επιταχυνόμενος ρυθμός εκβιομηχανοποίησης, σε συνδυασμό με την αστικοποίηση και την εντατικοποίηση της γεωργίας, έχουν οδηγήσει σε χημική ρύπανση του περιβάλλοντος. Μεταξύ των διαφόρων περιβαλλοντικών ρύπων, τα βαρέα μέταλλα συνιστούν ίσως από τους πιο επικίνδυνους ρύπους τόσο για το περιβάλλον όσο και για την υγεία των καταναλωτών. Τα βαρέα μέταλλα είναι στοιχεία με ατομικό αριθμό μεγαλύτερο του 20 που αποβαίνουν τοξικά εάν η συγκέντρωσή τους υπερβεί ορισμένα, χαμηλά συνήθως, όρια. Η επικινδυνότητά τους έγκειται στο γεγονός ότι δεν αποδομούνται αλλά συσσωρεύονται στο περιβάλλον όπου μένουν ενεργά, εν συνεχεία αφομοιώνονται από καλλιεργούμενα είδη-συσσωρευτές και τελικά εισέρχονται στους οργανισμούς διαμέσου της τροφικής αλυσίδας. Πρόσφατες έρευνες σχετικά με τη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων σε τρόφιμα καταδεικνύουν ότι λαχανικά προερχόμενα από βιομηχανικές περιοχές, περιέχουν βαρέα μέταλλα σε συγκεντρώσεις που αποβαίνουν τοξικές για την ανθρώπινη υγεία.

Η είσοδος βαρέων μετάλλων στα φυτικά κύτταρα προκαλεί σοβαρές μεταβολικές και βιοχημικές μεταβολές που οδηγούν σε αναστολή της ανάπτυξης, μείωση της απόδοσης αλλά και αδυναμία επιβίωσης των φυτικών οργανισμών. Η φυτοτοξικότητά τους εξαρτάται κυρίως από την βιοδιαθεσιμότητά τους, δηλαδή την ικανότητά τους να συσσωρεύονται στα φυτά, μέσω των οποίων εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα. Η αντίσταση των φυτών συνίσταται σε δύο κύριες στρατηγικές, την αποφυγή, που αφορά σε αποκλεισμό των βαρέων μετάλλων στο εξωτερικό περιβάλλον, και την ανθεκτικότητα, που έγκειται σε μηχανισμούς δέσμευσης και εξουδετέρωσής τους από εξειδικευμένα κυτταρικά μόρια.

Στόχο της παρούσας έρευνας αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης γονοτύπων μαρουλιού ως προς την ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα, και συγκεκριμένα σε περίσσεια καδμίου και ψευδαργύρου. Δεδομένου ότι η αποτελεσματικότητα των σχετικών διαδικασιών αξιολόγησης γενετικού υλικού έγκειται στην αξιόπιστη διάκριση της ανθεκτικότητας και ευαισθησίας, παράλληλο στόχο αποτέλεσε ο προσδιορισμός κατάλληλων μεθόδων επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Για την επίτευξη των ανωτέρω στόχων, οι υπό μελέτη γονότυποι αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε περίσσεια βαρέων μετάλλων α) στη φάση της βλάστησης και β) σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια και ακολούθησε η εκτίμηση της

συσχέτισης της ανθεκτικότητας κατά τα στάδια αυτά ώστε να διαπιστωθεί η αξιοπιστία της πρώιμης επιλογής επιθυμητών γονοτύπων. Αρχικά, έγινε *in vitro* αξιολόγηση του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης 14 εμπορικών ποικιλιών μαρουλιού, που ανήκουν στις 4 κύριες βοτανικές ομάδες -ρωμάνα, λείο κεφαλωτό, κατσαρό κεφαλωτό, σαλάτα-, σε θρεπτικό μέσο ½ MS που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0, 50, 100, 200 μM), ZnCl₂ (0, 5, 10, 15 mM) και CdCl₂ / ZnCl₂ (100 μM / 10 mM). Ως παράμετροι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας αξιοποιήθηκαν το ποσοστό βλάστησης, το μήκος ρίζας και βλαστού και ο αριθμός σπορόφυτων με μη φυσιολογικό φαινότυπο. Τα αποτελέσματα παρείχαν τη δυνατότητα διάκρισης των φαινοτύπων ανθεκτικότητας και ευαισθησίας στο στάδιο αυτό και επιπλέον, επέτρεψαν την κατηγοριοποίηση των ποικιλιών σε ανθεκτικές, μέτριας ανθεκτικότητας και ευαίσθητες σε βαρέα μέταλλα. Βάσει της κατηγοριοποίησης αυτής, επιλέχθηκαν 6 γονότυποι -2 από κάθε κατηγορία- προκειμένου να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητά τους και σε μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο. Για το σκοπό αυτό, υγιή φυτά στο στάδιο των 5-8 πραγματικών φύλλων υποβλήθηκαν σε καταπόνηση βαρέων μετάλλων με πότισμα με διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων CdCl₂ (0, 50, 100, 200 μM) και CdCl₂ / ZnCl₂ (100 μM / 10 mM). Ως παράμετροι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας αξιοποιήθηκαν η ανάπτυξη συμπτωμάτων καταπόνησης, το ποσοστό περιεχόμενης χλωροφύλλης, το ύψος των φυτών, το νωπό και ξηρό βάρος των φυτών. Τα ευρήματα της μελέτης παρέχουν ενδείξεις για ικανοποιητική συσχέτιση της ανθεκτικότητας κατά τη φάση της βλάστησης και τα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια και υπογραμμίζουν τη δυνατότητα πρώιμης επιλογής ανθεκτικών γονοτύπων.

Λέξεις κλειδιά: μαρούλι, ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, καταπόνηση από βαρέα μέταλλα, κάδμιο, ψευδάργυρος, πρώιμη επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων

Summary

In recent decades, the accelerating pace of industrialization, coupled with urbanization and intensification of agriculture, have led to environmental chemical pollution. Among various environmental pollutants, heavy metals are probably the most dangerous pollutants for the environment as well as consumers' health. Heavy metals are elements with an atomic number greater than 20 that become toxic if their concentration exceeds some, usually low, limits. Hazards arising by heavy metals relate to the fact that they are not degraded but instead, they accumulate in the environment where they are active and they are subsequently assimilated by cultivated species to end up in organisms through the food chain. Recent studies related to the concentration of heavy metals in food indicates that vegetables cultivated in industrial areas contain heavy metals at concentrations that are toxic for human health.

The accumulation of heavy metals into plant cells causes severe metabolic and biochemical alterations that lead to inhibition of growth, reduction of yield but also failure of survival. Their phytotoxicity is mainly depended on their bioavailability, ie their ability to accumulate in plants through which they enter the food chain. Plant tolerance relies on two main strategies, the avoidance, which involves the exclusion of heavy metals in the external environment, and the resistance which refers to mechanisms that bind and neutralize heavy metals through specialized cellular molecules.

Aim of the present thesis was to study the response of lettuce genotypes under conditions of heavy metal stress, namely excess of cadmium and zinc. Given that the effectiveness of relevant evaluation procedures lies in the reliable discrimination of resistance and sensitivity, a parallel aim referred to the identification of suitable methods for the selection of desirable genotypes at early growth stages. Towards this direction, the genotypes under study were assessed, in terms of resistance to excess of heavy metals (a) during germination phase and (b) at later developmental stages, and subsequently correlation of resistance was assessed as a means to determine the robustness of early selection of desirable genotypes. Initially, an *in vitro* evaluation was aimed at estimating the seed germination and seedling growth potential of 14 commercial lettuce varieties belonging to the four main botanical groups -raw, headed, crowned, salad-. Evaluation was performed in $\frac{1}{2}$ MS medium containing different concentrations of CdCl_2 (0, 50, 100, 200 μM), ZnCl_2 (0.5, 10, 15 mM) and CdCl_2 / ZnCl_2 (100 μM / 10 mM) and was conducted on the basis of

germination percentage, root and stem length and number of seedlings with an abnormal phenotype. The results provided the possibility to discriminate the phenotypes of resistance and susceptibility at this stage, and moreover allowed for the categorization of varieties to resistant, moderate resistant and susceptible to heavy metals. Based on this ranking, 6 genotypes -2 of each category- were selected for the means of assessing their resistance/susceptibility at later growth stages. To this purpose, healthy plants at stage of 5-8 true leaves were subjected to heavy metal stress, through irrigation with solutions of different concentrations of CdCl₂ (0, 50, 100, 200 µM) and CdCl₂ / ZnCl₂ (100 µM / 10 mM). As criteria for evaluation of resistance served the development of stress-related symptoms, chlorophyll content, plant height and fresh and dry biomass weight. Overall findings provide evidence for satisfactory correlation of resistance at germination and later growth stages, thus underlining the possibility of conducting early selection of desirable genotypes.

Keywords: lettuce, abiotic stress tolerance, heavy metal stress, cadmium, zinc, early genotypic selection

Εγώ ο Λέανδρος Μαγγιώρος είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Ως επιβλέπουσα της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι ο όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από τον κ. Λέανδρο Μαγγιώρο.



Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	21 -
1.1 Καταγωγή - Ιστορική αναδρομή μαρουλιού	22 -
1.2 Βοτανική ταξινόμηση και περιγραφή	24 -
1.3 Θρεπτική αξία	28 -
1.4 Κλιματικές απαιτήσεις - Έδαφος	30 -
1.5 Αβιοτικές καταπονήσεις.....	31 -
1.6 Στάδια απόκρισης του φυτού σε αβιοτικές καταπονήσεις	34 -
1.7 Μηχανισμοί αντοχής έναντι αβιοτικών καταπονήσεων.....	36 -
1.8 Καταπόνηση από αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων	38 -
1.8.1 Βαρέα μέταλλα	38 -
1.8.2 Πηγές μόλυνσης.....	39 -
1.8.3 Επιπτώσεις των βαρέων μετάλλων στα φυτά	41 -
1.8.4 Κάδμιο (Cd)	43 -
1.8.5 Ψευδάργυρος (Zn).....	44 -
1.9 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των βαρέων μετάλλων	45 -
1.9.1 Μηχανισμός αποφυγής	46 -
1.9.2 Μηχανισμός εσωτερικής ανθεκτικότητας.....	47 -
Σκοπός της μελέτης.....	51 -
2. Υλικά και μέθοδοι.....	52 -
2.1. Φυτικό υλικό.....	52 -
2.2 Απολύμανση σπόρων	53 -
2.3 Μεταχειρίσεις καταπόνησης - Πειραματικό σχέδιο.....	53 -
2.3.1 Στάδιο βλάστησης – In vitro συνθήκες.....	53 -
2.3.2 Μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια – Πείραμα θερμοκηπίου.....	55 -

2.4	Καταπόνηση με βαρέα μέταλλα.....	55 -
2.4.1	Στάδιο βλάστησης – In vitro συνθήκες.....	55 -
2.4.2	Μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια – Πείραμα θερμοκηπίου.....	56 -
2.5	Παράμετροι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας	57 -
2.5.1	Μετρήσεις στο στάδιο βλάστησης.....	58 -
2.5.2	Μετρήσεις σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια.....	58 -
2.6	Στατιστική ανάλυση	60 -
	Αποτελέσματα.....	61 -
3.1	Καταπόνηση από βαρέα μέταλλα στη φάση της βλάστησης.....	61 -
3.1.1	Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων	62 -
3.1.2	Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στα αναπτυξιακά γνωρίσματα των σπορόφυτων	68 -
3.2	Καταπόνηση από βαρέα μέταλλα σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια.....	82 -
3.2.1	Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στο χλωρό βάρος φυτών μαρουλιού . -	82 -
3.2.2	Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στο ξηρό βάρος φυτών μαρουλιού ... -	87 -
3.2.3	Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στο ύψος των φυτών μαρουλιού -	93 -
3.2.4	Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στη χλωροφύλλη των φυτών μαρουλιού	100 -
4.	Συζήτηση.....	109 -
5.	Συμπεράσματα	118 -
6.	Βιβλιογραφία	120 -

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 Κυριότερες χώρες παραγωγής μαρουλιού στην Ευρώπη κατά το έτος 2016	22
Πίνακας 1.2 Θρεπτική αξία 3 διαφορετικών τύπων μαρουλιού (Romana, green leaf, iceberg) ανά 100 g προϊόντος	28
Πίνακας 2.1 Εμπορικές ποικιλίες που αξιολογήθηκαν ως προς την απόκρισή τους σε καταπόνηση από υψηλή συγκέντρωση καδμίου, ψευδαργύρου καθώς και της συνδυασμένης δράσης	51
Πίνακας 2.2 Ποικιλίες μαρουλιού όπου επιλέχθηκαν 6 γονοτυποι -2 από κάθε κατηγορία- προκειμένου να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητά τους σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια	53
Πίνακας 2.3 Σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας σε συνθήκες in vitro	54
Πίνακας 3.1 Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων σε 14 εμπορικές ποικιλίες.	61
Πίνακας 3.2. Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ποσοστού βλάστησης μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)).	65
Πίνακας 3.3 Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο μήκος ρίζας σπορόφυτων μαρουλιού σε 14 εμπορικές ποικιλίες μαρουλιού	67
Πίνακας 3.4 Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου στο	68

μήκος βλαστού σπορόφυτων μαρουλιού σε 14 εμπορικές ποικιλίες μαρουλιού

Πίνακας 3.5 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του μήκους ρίζας μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)). 70

Πίνακας 3.6 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του μήκους βλαστού μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)). 74

Πίνακας 3.7 Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο χλωρό βάρος φυτών μαρουλιού σε 6 διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες. 81

Πίνακας 3.8 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του χλωρού βάρους μεταξύ των 6 διαφορετικών ποικιλιών. 84

Πίνακας 3.9 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του χλωρού βάρους μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)). 86

Πίνακας 3.10 Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο ξηρό βάρος φυτών μαρουλιού σε 6 διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες 87

Πίνακας 3.11 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ξηρού βάρους μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)). 87

Πίνακας 3.12 Αξιολόγησης της διαφοροποίησης του ξηρού βάρους μεταξύ των 6 διαφορετικών ποικιλιών. 90

Πίνακας 3.13 Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο ύψος φυτών μαρουλιού σε 6 διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες.	93
Πίνακας 3.14 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ύψους μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)).	94
Πίνακας 3.15 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ύψους μεταξύ των 6 διαφορετικών ποικιλιών.	96
Πίνακας 3.16 Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στη χλωροφύλλη φυτών μαρουλιού σε 6 διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες.	100
Πίνακας 3.17 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ποσοστού χλωροφύλλης μεταξύ των 6 διαφορετικών ποικιλιών.	101
Πίνακας 3.1 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ποσοστού χλωροφύλλης μεταξύ των διαφορετικών ημερομηνιών παρατήρησης	104
Πίνακας 3.2 Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ποσοστού χλωροφύλλης μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)).	105

Κατάλογος Εικόνων-Σχημάτων

Εικόνα 1.1 Ταξιανθία μαρουλιού	22
Εικόνα 1.2 Καρπός μαρουλιού	25
Εικόνα 1.3 Τύπος Batterhead ή αλλιώς λείο κεφαλωτό	26
Εικόνα 1.4 Τύπος crisphead ή αλλιώς κατσαρό κεφαλωτό	26
Εικόνα 1.5 Τύπος Cos-Romana	26
Εικόνα 1.6 Τύπος Looseleaf	27
Εικόνα 1.7 Τύπος stem-lettuce ή αλλιώς κινέζικο	27
Εικόνα 1.8 Περιοχή επίδρασης ενός παράγοντα σε σχέση με την ικανότητα ενός οργανισμού να επιτελέσει τις απαραίτητες λειτουργίες προκειμένου να καταστεί εφικτή η ανάπτυξη και η επιβίωσή του	31
Εικόνα 1.9 Απόκριση των φυτών στις καταπονήσεις. Η αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού και παράγοντα καταπόνησης εξαρτάται από παράγοντες που σχετίζονται με το φυτό και με την καταπόνηση per se	34
Εικόνα 1.10 Στάδια απόκρισης των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης	35

Εικόνα 1.11 Πηγές χημικής ρύπανσης από βαρέα μέταλλα, τρόπος μεταφοράς, απόθεσης και δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον	39
Εικόνα 1.12 Πιθανοί μηχανισμοί απόκρισης των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα	46
Εικόνα 2.1 Φασματοφωτόμετρο UV-1800 όπου προσδιορίστηκε το ποσοστό περιεχόμενης χλωροφύλλης των καταπονημένων από βαρέα μέταλλα φυτών και των φυτών μαρτύρων	58
Εικόνα 3.1 Βλάστηση και ανάπτυξη διαφορετικών γονοτύπων μαρουλιού υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)). (A) Green Batavia, (B) Μαρούλι Γαλλικό - Santa 12Anna, (C) Μαρούλι σγουρό - Black Simson και (D) Ortis Doris κατά τν 12 ^η ημέρα της καταπόνησης (1/04/2018).	64
Εικόνα 3.2 Απεικόνιση της απόκρισης σπόρόφυτων της ποικιλίας Lattuga Grandi Loghi-Brasiliانا στο μεσαίο (100 μM), υψηλό (200 μM) επίπεδο καταπόνησης Cd και στη συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn ως προς το γνώρισμα του μήκους ρίζας σε δύο διαφορετικές ημερομηνίες καταπόνησης (πάνω εικόνα= 17 ^η ημέρα καταπόνησης και δεύτερη κάτω εικόνα= 20 ^η ημέρα καταπόνησης).	73
Εικόνα 3.3 Απόκριση των σπορόφυτων της ποικιλίας Geo store Manchester στο μεσαίο (A) και υψηλό επίπεδο στρες Cd (B) και στη συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn (C) ως προς την ανάπτυξη της ρίζας σε δύο διαφορετικές ημερομηνίες παρατήρησης (A1, B1, C1: 15 ^η ημέρα καταπόνησης (04/04/2018) και A2, B2, C2: 20 ^η ημέρα καταπόνησης (09/04/2018)).	78
Εικόνα 3.4 Απεικόνιση των 6 επιλεγμένων ποικιλιών που κατηγοριοποιήθηκαν ως ανθεκτικές, μέτριας ανθεκτικότητας και ευαίσθητες στα υπό μελέτη επίπεδα καταπόνησης καδμίου. A. Control, B. Cd: 50 μM , C. Cd: 100 μM , D. Cd: 200 μM κατά την τελευταία ημερομηνία παρατήρησης (23 ^η ημέρα καταπόνησης) (12/04/2018).	79

Εικόνα 3.5 Απεικόνιση 3 επιλεγμένων ποικιλιών που κατηγοριοποιήθηκαν ως ανθεκτικές (Lattuga Grandi Loghi Brasilliana), μέτριας ανθεκτικότητας (Geostor Manchester) και ευαίσθητες (Romana Green Tower) στα υπό μελέτη επίπεδα καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) κατά την τελευταία ημερομηνία παρατήρησης (16/07/2018).

98

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 1.1 Παγκόσμια παραγωγή μαρουλιού	22
Γράφημα 1.2 Παγκόσμια έκταση καλλιέργειας και παγκόσμια παραγωγή μαρουλιού κατά τα έτη 2010-2016	23
Γράφημα 3.1 Ποσοστό βλάστησης σπόρων μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) από την 3 ^η έως την 20 ^η μέρα από την έναρξη της καταπόνησης.	63
Γράφημα 3.2 Ποσοστό βλάστησης σπόρων μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) κατά τις 5 ημερομηνίες λήψης παρατηρήσεων.	66
Γράφημα 3.3 Μήκος ρίζας σπορόφυτων μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) κατά τις 5 ημερομηνίες λήψης παρατηρήσεων.	71
Γράφημα 3.4 Μήκος ρίζας σπορόφυτων μαρουλιού ανά ποικιλία και ημερομηνία παρατήρησης μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)).	72
Γράφημα 3.5 Μήκος βλαστού σπορόφυτων μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) κατά τις 4 ημερομηνίες λήψης παρατηρήσεων.	76
Γράφημα 3.6 Μήκος βλαστού σπορόφυτων μαρουλιού ανά ποικιλία και ημερομηνία παρατήρησης μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)).	77
Γράφημα 3.7 Χλωρό βάρος ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) κατά την ημέρα (24/07/2018). Κάτω Γράφημα: Χλωρό βάρος ανά ποικιλία συναρτήσει των αντίστοιχων τιμών για τις ποικιλίες Lattuga Grandi-Brasiliana (1) και Red Batavia (8).	83

Γράφημα 3.8 Ξηρό βάρος ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) (07/08/2018). Κάτω Γράφημα: Ξηρό βάρος ανά ποικιλία συναρτήσει των αντίστοιχων τιμών για τις ποικιλίες Lattuga Grandi-Brasiliana (1) και Red Batavia (8).	92
Γράφημα 3.9 Ύψος φυτών μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) (07/08/2018) σε 3 διαφορετικές ημερομηνίες.	99
Γράφημα 3.10 Ποσοστό χλωροφύλλης φυτών μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) σε 2 διαφορετικές ημερομηνίες.	103
Γράφημα 3.11 Ποσοστό χλωροφύλλης φυτών μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)).	106
Γράφημα 3.12 Περιεκτικότητα χλωροφύλλης ανά επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) και ανά ποικιλία.	107
Σχήμα 3.1 Ποικιλίες μαρουλιού που επιλέχθηκαν για περαιτέρω αξιολόγηση σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια.	81

Εισαγωγή

Γενικά

Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί μια σημαντική αλλαγή στη διατροφική συμπεριφορά των καταναλωτών που αφορά κυρίως σε επιλογή υγιεινών τροφίμων με υψηλή θρεπτική αξία, υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες και ιχνοστοιχεία και χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Η υιοθέτηση μιας ισορροπημένης υγιεινής διατροφής, σύμφωνα με το μεσογειακό διατροφικό μοντέλο, ταυτίζεται, μεταξύ άλλων, με την άφθονη κατανάλωση λαχανικών. Το μαρούλι, λόγω της λεπτής, ουδέτερης γεύσης του αλλά και της μεγάλης θρεπτικής του αξίας, κατέχει κυρίαρχη θέση στην προτίμηση του καταναλωτικού κοινού σε σχέση με άλλα λαχανικά. Η ευρεία καταναλωτική αποδοχή του μαρουλιού οφείλεται επίσης στο γεγονός ότι χρησιμοποιείται νωπό σε σαλάτες, σκέτο ή σε συνδυασμό με άλλα λαχανικά και φρούτα, αλλά και για την παρασκευή διάφορων μαγειρεμένων φαγητών. Για τους ανωτέρω λόγους, θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά φυλλώδη λαχανικά και ανέρχεται στις πρώτες θέσεις αρεσκείας του καταναλωτικού κοινού.

Από την άλλη μεριά, ο επιταχυνόμενος ρυθμός εκβιομηχανοποίησης, που έχει συντελεστεί τις τελευταίες δεκαετίες, σε συνδυασμό με την αστικοποίηση και την εντατικοποίηση της γεωργίας, έχουν οδηγήσει σε χημική ρύπανση του περιβάλλοντος. Μεταξύ των διαφόρων περιβαλλοντικών ρύπων, που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της ανθρωπογενούς δραστηριότητας, τα βαρέα μέταλλα αποτελούν ίσως από τους πιο επικίνδυνους ρύπους τόσο για το περιβάλλον όσο και για την υγεία των καταναλωτών. Η επικινδυνότητά τους έγκειται στο γεγονός ότι δεν αποδομούνται αλλά συσσωρεύονται στο περιβάλλον όπου μένουν ενεργά επι σειρά ετών, εν συνεχεία αφομοιώνονται από καλλιεργούμενα είδη-συσσωρευτές και τελικά εισέρχονται σε ποικίλους οργανισμούς διαμέσου της τροφικής αλυσίδας. Στο πλαίσιο αυτό, πρόσφατες έρευνες σχετικά με τη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων σε τρόφιμα καταδεικνύουν ότι λαχανικά προερχόμενα από βιομηχανικές περιοχές, όπου ο υδροφόρος ορίζοντας και το έδαφος είναι μολυσμένα από βιομηχανικά απόβλητα, περιέχουν βαρέα μέταλλα σε συγκεντρώσεις που αποβαίνουν τοξικές για την ανθρώπινη υγεία. Δεδομένου ότι αρκετά φυλλώδη λαχανικά θεωρούνται υπερσυσσωρευτές των βαρέων μετάλλων (Achakzai et al., 2011), καθίσταται αναγκαία η διερεύνηση της

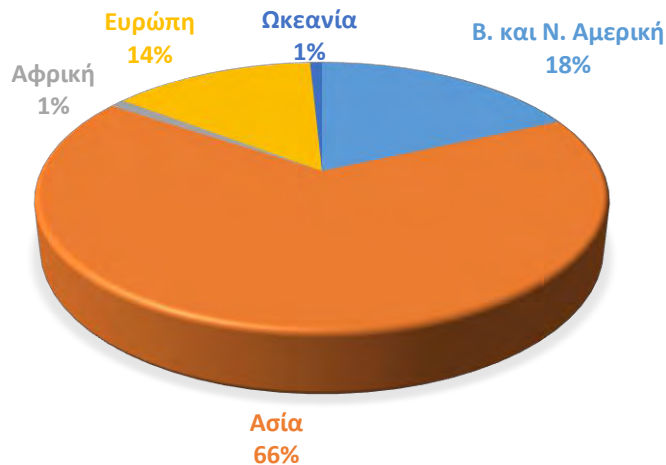
δυνατότητας συσσώρευσης βαρέων μετάλλων στα βρώσιμα μέρη σημαντικών κηπευτικών, όπως το μαρούλι, σε ποσότητες που δύνανται να καταστούν τοξικές έπειτα από ανθρώπινη κατανάλωση.

1.1 Καταγωγή - Ιστορική αναδρομή μαρουλιού

Το καλλιεργούμενο μαρούλι, με επιστημονική ονομασία *Lactuca sativa* L. θεωρείται ότι προέρχεται από την Τουρκία και τη Μέση Ανατολή. Φημολογείται πως πρόγονός του είναι το άγριο είδος μαρουλιού *Lactuca serriola* ή *scariola* L., το οποίο θεωρείται ζιζάνιο σε όλη την Ευρώπη και αυτοφύεται στην Ελλάδα, ή ότι προήλθε από διασταυρώσεις με άγρια είδη όπως το *L. saligna* και *L. virosa* (Zohary, 1991). Στο γένος *Lactuca*, περιλαμβάνονται πάνω από 100 είδη, εκ των οποίων τα 17 είναι Ευρωπαϊκά, τα 10 προέρχονται από τη Βόρεια Αμερική, τα 33 τροπικά από την Ανατολική Αφρική και τα 40 είναι ασιατικά είδη.

Το μαρούλι συγκαταλέγεται στα λαχανικά με τη μεγαλύτερη ιστορία σε αρκετά μέρη της Γης. Είναι γνωστό από την αρχαιότητα, όπως αποδεικνύεται από γραφές καθώς και απεικονίσεις που έχουν βρεθεί σε Αιγυπτιακούς τάφους από το 4500 π.Χ. (Linuqvist, 1960). Η δρόγη του στην αρχαιότητα χρησιμοποιούνταν για τις φαρμακευτικές και θεραπευτικές της ιδιότητες, ενώ παράλληλα χρησιμοποιούνταν σε καταπραϊντικά σιρόπια, και έπειτα ως λαχανικό. Στην ιστορία αναφέρεται από τον Ηρόδοτο, Θεόφραστο και τον Διοσκουρίδη η ονομασία "θρίδαξ". Ακόμη, αναφέρεται ως λαχανικό επίσπορο, καθώς έχει την ικανότητα να σπαρθεί πολλές φορές κατά τη διάρκεια ενός έτους (Ολύμπιος, 2001).

Το μαρούλι άρχισε να καλλιεργείται και να γίνεται γνωστό στην Κεντρική και Δυτική Ευρώπη τον 14^ο αιώνα, ενώ στην Κίνα τον 8^ο αιώνα. Καλλιεργείται για το φύλλωμά του και καταναλώνεται νωπό ή και μαγειρεμένο και οι σπόροι του μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ελαίου (de Vries, 1996). Είναι από τα πιο σημαντικά φυλλώδη λαχανικά και για τον λόγο αυτό, καλλιεργείται σχεδόν σε όλα τα μήκη και πλάτη της υφελίου. Στην Ασία, παράγεται το 66% περίπου, το 14% στην Ευρώπη, το 18% στην Βόρεια και Νότια Αμερική και το υπόλοιπο 2% στην Αφρική και Ωκεανία (Γράφημα 1.1).

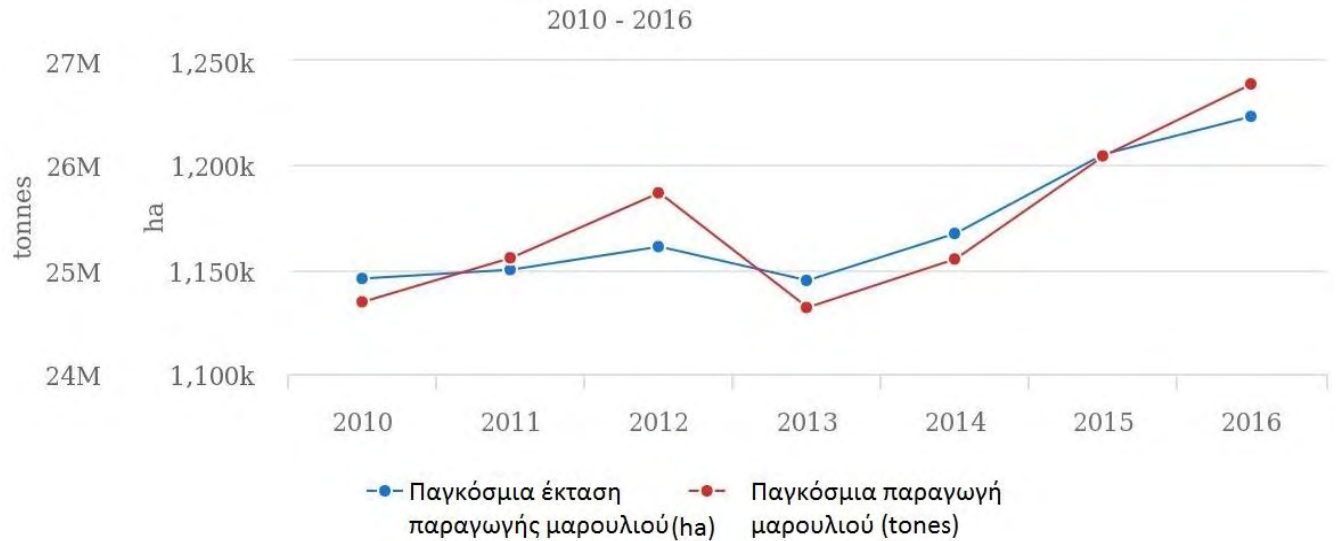


Γράφημα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή μαρουλιού. (Πηγή: FAOSTAT)

Οι κυριότερες χώρες παραγωγής στην Ευρώπη για το έτος 2016 παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1, ενώ στο Γράφημα 1.2 απεικονίζεται η παγκόσμια έκταση και παραγωγή του μαρουλιού από το έτος 2010 έως το 2016.

Πίνακας 1.1: Κυριότερες χώρες παραγωγής μαρουλιού στην Ευρώπη κατά το έτος 2016. (Πηγή: FAOSTAT)

Ευρωπαϊκές χώρες	Καλλιεργούμενη έκταση (hg/ha)	Παραγωγή (tn)
Ισπανία	266.788	930.081
Ιταλία	214.297	735.967
Γαλλία	260.557	228.378
Ολλανδία	335.414	118.200
Ηνωμένο Βασίλειο	221.382	106.551
Ελλάδα	117.565	69.547
Βέλγιο	406.244	52.568
Αυστρία	291.887	48.716
Σουηδία	200.736	32.720
Σλοβενία	146.625	21.070



Γράφημα 1.2: Παγκόσμια έκταση καλλιέργειας και παγκόσμια παραγωγή μαρουλιού κατά τα έτη 2010 - 2016. (Πηγή: FAOSTAT)

1.2 Βοτανική ταξινόμηση και περιγραφή

Το μαρούλι ανήκει στην οικογένεια των σύνθετων (Asteracea), η οποία είναι μια από τις μεγαλύτερες της διαίρεσης των Αγγειόσπερμων. Στην οικογένεια αυτή, ανήκουν και φυτά όπως το ραδίκι, το αντίδι, η αγκινάρα και ο ηλιάνθος. Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες μαρουλιού έχουν 9 ζεύγη χρωμοσωμάτων ($2n = 18$). Είναι φυτό μακράς ημέρας, με αποτέλεσμα να μην παράγει ανθικό στέλεχος και άνθη όταν η διάρκεια της ημέρας είναι μικρότερη από 12 ώρες.

Είναι ετήσιο ποώδες φυτό με επιφανειακό ριζικό σύστημα. Ωστόσο, σχηματίζει πασσαλώδη, κεντρική ρίζα η οποία φθάνει σε βάθος έως και 60 cm.

Τα φύλλα είναι πλατιά, ποικίλουν στο μέγεθος και στο σχήμα και διαθέτουν λεία ή κυματοειδή επιφάνεια. Είναι διατεταγμένα πάνω στο βλαστό, με αποτέλεσμα να σχηματίζουν τύπο ροζέτας. Το χρώμα των φύλλων ποικίλει από βαθύ πράσινο έως και πρασινοκίτρινο, ενώ υπάρχουν και καλλιεργούμενες ποικιλίες με κοκκινωπό χρώμα (Ολύμπιος, 2001) .

Ο βλαστός έχει μικρό ύψος κατά το αναπτυξιακό στάδιο και αποτελείται από μικρά μεσογονάτια διαστήματα. Το στέλεχος του φυτού μπορεί να φθάσει έως και τα 1,4 m, μόνο όμως όταν βρίσκεται στο ανθικό στάδιο (Πασσάμ, 2013).

Τα άνθη διατάσσονται πάνω στο ανθικό στέλεχος υπό μορφή κορυμβόμορφου βότρυος ή φόβης με πολύ μικρές κεφαλές ανθέων (Εικόνα 1.1). Κάθε άνθος είναι σύνθετο και περιέχει 10 έως 20 ανθίδια, με κάθε ένα από αυτά έχει ένα κίτρινο πέταλο, 5 στήμονες ενωμένους και μια ωοθήκη. Οι 5 στήμονες ενωμένοι σχηματίζουν σωλήνα γύρω από το στύλο και το στίγμα. Η άνθηση πραγματοποιείται το πρωί καθώς τα ανθίδια ανοίγουν 1-2 ώρες το πρωί αλλά δεν ανοίγουν σχεδόν όλα ταυτόχρονα (Χα και Πετρόπουλος., 2014). Εξαιτίας της μορφής και της κατασκευής του άνθους (κώνος ανθέων, πτώση γύρης στο στίγμα), η αναπαραγωγή γίνεται με αυτογονιμοποίηση (σε ποσοστό έως και 99 %), ενώ η σταυρογονιμοποίηση είναι σπάνια καθώς τα άνθη του δεν έλκουν έντομα και η μορφολογία τους δεν επιτρέπει την ευχερή μεταφορά γύρης.



Εικόνα 1.1: Ταξιανθία μαρουλιού.

Ο καρπός είναι αχαίνιο, μικρός, επιμήκης (3-4 mm), χρώματος πρασινωπού, λευκού/υπόλευκου ή γκριζωπού (Εικόνα 1.2). Ο καρπός του μαρουλιού φέρει πάππο (χνούδι), το οποίο πρέπει να

αφαιρείται. Το διάστημα από την γονιμοποίηση έως και την ωρίμανση του σπόρου κυμαίνεται από 12 έως 21 μέρες, ανάλογα με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες.



Εικόνα 1.2: Καρπός μαρουλιού.

Το μαρούλι ταξινομείται, ανάλογα με τη μορφή και τη διάταξη των φύλλων αλλά και τον σχηματισμό ή όχι κεφαλής, σε πέντε διαφορετικούς βοτανικούς τύπους (de Vries, 1996).

1. Λείο κεφαλωτό - *L. sativa* var. *capitata* D.C (butterhead). Είναι από τους πιο διαδεδομένους τύπους στη Βόρεια Ευρώπη, αλλά καλλιεργείται αρκετά και στην Ελλάδα. Τα φύλλα είναι μαλακά με ανοικτό έως σκούρο πράσινο χρώμα και σχηματίζουν μια χαλαρή και σφαιρική κεφαλή (Εικόνα 1.3).
2. Κατσαρό κεφαλωτό - *L. sativa* var. *capitata* D.C (crisphead-iceberg). Η καλλιέργεια αυτού του τύπου είναι περισσότερο διαδεδομένη στην Αμερική. Τα φύλλα της είναι τραγανά, κυματοειδή, με αποτέλεσμα να είναι αρκετά εύθραστα, και η κεφαλή που σχηματίζει είναι σφαιρική πράσινου χρώματος (Εικόνα 1.4).
3. Κώς ή Ρομάνα - *L. sativa* var. *longifolia* Lam. Αυτός ο τύπος μαρουλιού φημολογείται πως καλλιεργείται από τη ρωμαϊκή εποχή στη νήσο Κώς, από όπου πήρε και το όνομά του. Αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τύπο στην Ελλάδα αλλά και στη Μέση Ανατολή και Βόρεια Αφρική. Χαρακτηρίζεται από αρκετά υψηλά φύλλα, χρώματος πράσινου σχηματίζοντας σφικτή επιμήκη κεφαλή (Εικόνα 1.5).
4. Σαλάτα χωρίς κεφαλή – *L. sativa* var. *crispa* L (looseleaf). Τα φύλλα αυτού του τύπου είναι κατσαρά και κυματοειδή, ενώ απουσιάζει ο σχηματισμός κεφαλής. Τα χρώματα ποικίλουν, ανάλογα με την ποικιλία (Εικόνα 1.6).

5. Κινέζικο - *L. sativa* var. *asparagina* Bailey. Η περιοχή καλλιέργειας αυτού του τύπου είναι η Ασία και το στέλεχος του είναι σαρκώδες (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.3: Τύπος *Butterhead* ή αλλιώς λείο κεφαλωτό.



Εικόνα 1.4: Τύπος *crisphead-iceberg* ή αλλιώς κατσαρό κεφαλωτό.



Εικόνα 1.5: Τύπος *Cos-Romana*.



Εικόνα 1.6: Τύπος *Looseleaf*.



Εικόνα 1.7: Τύπος *stem-lettuce* ή αλλιώς κινέζικο.

1.3 Θρεπτική αξία

Το μαρούλι είναι από τα πιο ευρέως διαδεδομένα φυλλώδη λαχανικά και η θρεπτική του αξία είναι αρκετά μεγάλη. Έχει χαμηλές θερμίδες καθώς αποτελείται σχεδόν κατά 85% από νερό και για αυτό συνιστάται για την διατροφή ατόμων που επιθυμούν να χάσουν βάρος. Είναι μια πάρα πολύ καλή πηγή διάφορων ευεργετικών για την υγεία βιοδραστικών ενώσεων και ειδικότερα, συνιστά πολύτιμη πηγή φυτικών ινών, σιδήρου, φυλλικού οξέος και βιταμινών. Είναι πλούσιο σε βιταμίνη Α και Κ, β-καροτένιου, καλίου, ασβεστίου. Παρόλα αυτά, η σύσταση του μαρουλιού διαφέρει ανάλογα με τον τύπο. Περισσότερο θρεπτικά θεωρούνται τα μαρούλια τύπου leaf και romana καθώς έχουν υψηλές ποσότητες φυλλικού οξέος, εν αντιθέσει με το κόκκινο μαρούλι, το οποίο κατέχει υψηλή περιεκτικότητα σε φαιολικές ενώσεις (Kim et al., 2016). Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζεται συγκριτικά η θρεπτική αξία των τύπων μαρουλιού Romana, green leaf και iceberg.

Πίνακας 1.2: Θρεπτική αξία 3 διαφορετικών τύπων μαρουλιού (Romana, green leaf, iceberg) ανά 100 g προϊόντος. (Πηγή: USDA)

Θρεπτική αξία διαφόρων τύπων μαρουλιού			
	Romana	Green leaf	Iceberg
Θερμιδική αξία			
Σύνολο	17.0 (71.2 kJ)	15.0 (62.8 kJ)	14 (58.6 kJ)
από: Υδατάνθρακες	11.5 (48.1 kJ)	10.4 (43.5 kJ)	10.6 (44.4 kJ)
από: Λίπη	2.5 (10.5 kJ)	1.3 (5.4 kJ)	1.2 (5.0 kJ)
από: Πρωτεΐνες	3.0 (12.6 kJ)	3.3 (13.8 kJ)	2.2 (9.2 kJ)
από: Αλκοόλη	0.0 (0 kJ)	0.0 (0 kJ)	0.0 (0 kJ)
Υδατάνθρακες			
Σύνολο	3.3 g	2.8 g	3.2 g
Φυτικές ίνες	2.1 g	1.3g	1.2 g
Άμυλο	0.0 g	0.0 g	0.0 g
Σάκχαρα	1.2 g	0.8 g	2.0 g
Πρωτεΐνες και αμινοξέα			
Πρωτεΐνη	0.1 g	1.4 g	0.9 g
Λίπη και λιπαρά οξέα			
Σύνολο	0.3 g	0.2 g	0.1 g
Κορεσμένο λίπος	0.0 g	0.0 g	0.0 g
Μονοακόρεστο λίπος	0.0 g	0.0 g	0.0 g
Πολυακόρεστο λίπος	0.2 g	0.1 g	0.1 g
Σύνολο <i>trans</i> λιπαρών οξέων	~	~	~
Σύνολο διαμονοϊκών λιπαρών οξέων	~	~	~
Ολικά <i>trans</i> -πολυενοϊκά λιπαρά οξέα	~	~	~
Ολικά ωμέγα-3 λιπαρά οξέα	113 mg	58.0 mg	52.0 mg
Ολικά ωμέγα-6 λιπαρά οξέα	47 mg	24.0 g	21.0 mg
Βιταμίνες			
A	8711 IU	7404 IU	502 IU
C	24.0 mg	18 mg	2.8 mg
E	0.1 mg	0.3 mg	0.2 mg
K	103 mcg	174 mcg	24.1 mcg

Μεταλλικά στοιχεία			
Ασβέστιο	33 mg	36.0 mg	18.0 mg
Σίδηρος	1 mg	0.9 mg	0.4 mg
Μαγνήσιο	14 mg	13.0 mg	7.0 mg
Φώσφορος	30 mg	29.0 mg	20.0 mg
Κάλιο	247 mg	194.0 mg	141 mg
Νάτριο	8 mg	28.0 mg	10.0 mg
Ψευδάργυρος	0.2 mg	0.2 mg	0.2 mg
Χαλκός	0.0 mg	0.0 mg	0.0 mg
Μαγγάνιο	0.2 mg	0.3 mg	0.1 mg
Σελήνιο	0.4 mg	0.6 mcg	0.1 mcg

1.4 Κλιματικές απαιτήσεις - Έδαφος

Το μαρούλι είναι φυτό ψυχρής εποχής και καλλιεργείται καλύτερα την περίοδο φθινόπωρο-χειμώνα. Για την βλάστηση των σπόρων, η ιδανική θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 15-20 °C, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες εισέρχεται στην φάση του λήθαργου με επακόλουθη την αναστολή της βλάστησης. Η μέση θερμοκρασία ανάπτυξης είναι από 7-24 °C ενώ μπορεί να αντέξει και σε θερμοκρασίες μικρότερες από 5 °C. Παρόλα αυτά, η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί να είναι πλήρως ανασταλτική για την ανάπτυξη των φυτών. Η ιδανική θερμοκρασία για την ομαλή ανάπτυξη και αύξηση των φυτών κυμαίνονται μεταξύ 15-25 °C για την ημέρα και κατά 5-7 °C μικρότερη θερμοκρασία για την νύχτα. Ωστόσο, το θερμοκρασιακό εύρος ποικίλει ανάλογα από τον τύπο, την ποικιλία και την ένταση του φωτισμού. Θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 25 °C, οδηγούν σε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης, πρόωρη εισαγωγή στο αναπαραγωγικό στάδιο και πρόιμη άνθιση. Ο σχηματισμός συνεκτικής και γευστικής κεφαλής, προϋποθέτει την επικράτηση χαμηλών θερμοκρασιών, ενώ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 28 °C παρατηρείται αδυναμία σχηματισμού κεφαλής (Χα και Πετρόπουλος, 2014).

Ανάλογα με την απόκρισή τους στην φωτοπερίοδο, ως προς την ανθική επαγωγή, διακρίνονται δύο κατηγορίες ποικιλιών:

- Ουδέτερες ποικιλίες ως προς τη φωτοπερίοδο. Οι ποικιλίες αυτές είναι κατάλληλες για καλλιέργεια κατά την περίοδο άνοιξη-καλοκαίρι.
- Ποικιλίες μεγάλης φωτοπεριόδου. Οι ποικιλίες αυτές αξιοποιούνται για θερμοκηπιακή καλλιέργεια κατά τους χειμερινούς μήνες.

Ως προς τις εδαφικές απαιτήσεις, το μαρούλι προτιμά γόνιμα εδάφη, μέσης σύστασης και πλούσια σε οργανική ουσία. Ευδοκimei σε εδάφη με καλή ικανότητα συγκράτησης νερού, καλή στράγγιση και με τιμές pH που κυμαίνονται από 6 έως 7. Χαρακτηρίζεται ως φυτό ευαίσθητο στην υψηλή συγκέντρωση αλάτων, ενώ σε συνθήκες υψηλής αλατότητας σημειώνονται σημαντικές μεταβολές σε αναπτυξιακό, μορφολογικό και βιοχημικό επίπεδο. Σε αλατούχα εδάφη, συνιστάται η έκπλυση των αλάτων με σκοπό τη μεταφορά τους στα κατώτερα εδαφικά στρώματα.

1.5 Αβιοτικές καταπονήσεις

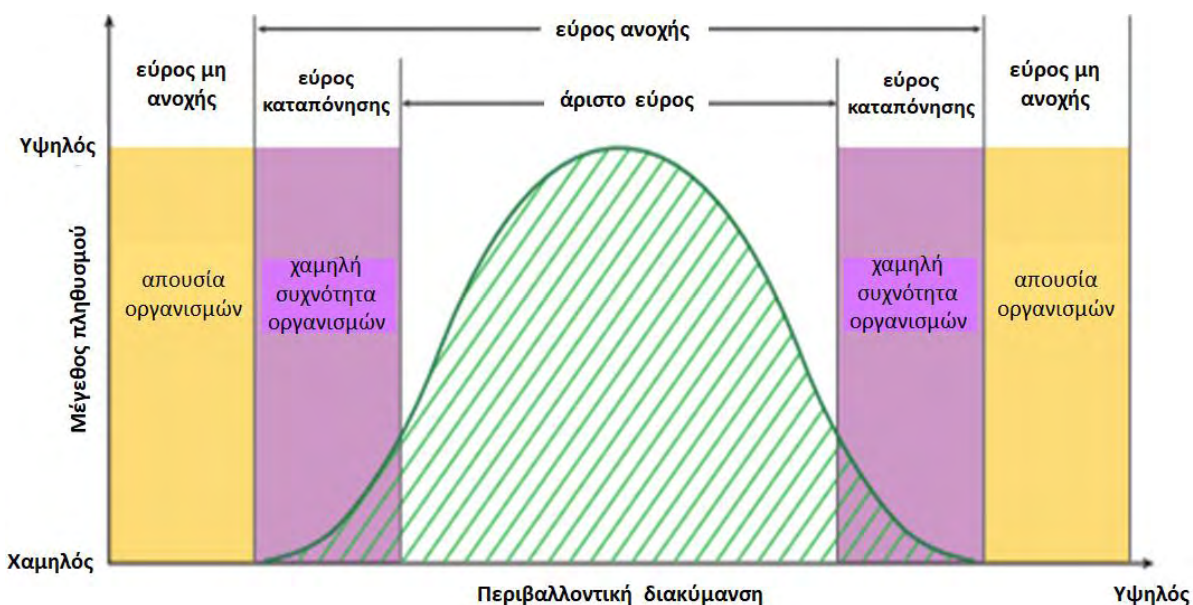
Τα φυτά, όντας ουδέτεροι οργανισμοί, στερούνται τη δυνατότητα απομάκρυνσης από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται, με αποτέλεσμα να πλήττονται συνεχώς από πληθώρα αβιοτικών καταπονήσεων. Οι επικρατούσες αβιοτικές καταπονήσεις επιφέρουν πλήθος δυσμενών επιπτώσεων, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού ανάπτυξης και απόδοσης των καλλιεργειών, ενώ υπό συνθήκες ακραίων καταπονήσεων καθίσταται αδύνατη η απρόσκοπτη ανάπτυξη και επιβίωση των φυτών.

Είναι γεγονός ότι οι αβιοτικές καταπονήσεις συνιστούν τον πλέον σημαντικό περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη και παραγωγικότητα των φυτών και στο πλείστο των περιπτώσεων δεν επιτρέπουν την επίτευξη του μέγιστου παραγωγικού δυναμικού των καλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το έτος 2003 στην Ευρώπη, έπειτα από ένα έντονο κύμα καύσωνα, σημειώθηκε δραστική μείωση -έως και 30 %- του δυναμικού απόδοσης των καλλιεργειών (Hirayama and Kazuo, 2010). Ως χάσμα απόδοσης ορίζεται η διαφορά μεταξύ του δυναμικού απόδοσης και της πραγματικής απόδοσης της καλλιέργειας (Gilliham et al., 2017).

Η αβιοτική καταπόνηση περιλαμβάνει όλους τους μη έμβιους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν δυσμενώς την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών. Σε αυτούς συγκαταλέγονται οι ακραίες θερμοκρασίες, η αυξημένη αλατότητα, η περίσσεια ή η έλλειψη

νερού, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η επίδραση δυνατών ανέμων, η ανοξία ή υποξία, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, η περίσσεια ιόντων ή βαρέων μετάλλων, η επίδραση μαγνητικών πεδίων αλλά ακόμη και η έκθεση σε υπερβολική ένταση ακτινοβολίας στο φάσμα του υπέρυθρου, ορατού, υπεριώδους και στις φασματικές περιοχές της ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Suzuki et.al., 2014).

Οι αβιοτικοί παράγοντες παρουσιάζουν αρκετά μεγάλη παρραλακτικότητα ως προς την ένταση και τη διάρκεια της καταπόνησης (Εικόνα 1.8). Η περιοχή στην οποία ένας φυτικός οργανισμός επιδέχεται την καταπόνηση αλλά καταφέρνει να επιβιώσει και να εκτελέσει τις βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες, με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται η ομαλή του ανάπτυξη, καλείται **εύρος ανοχής** (tolerance range). Εντός αυτής της περιοχής, υπάρχει ένα σημείο στο οποίο επιτυγχάνεται η **άριστη λειτουργία**, όπου ο οργανισμός αναπτύσσεται φυσιολογικά σαν να μην έχει δεχθεί την καταπόνηση (optimum). Στην περιοχή εκτός του εύρους ανοχής, δηλαδή σε **ζώνες μη ανοχής** (zones of intolerance), ο οργανισμός αδυνατεί να ανταπεξέλθει στην ένταση της καταπόνησης, με αποτέλεσμα να οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο. Κάθε παράγοντας καταπόνησης που υπερβαίνει τα όρια ανοχής καλείται **περιοριστικός παράγοντας**.



Εικόνα 1.8: Περιοχή επίδρασης ενός παράγοντα σε σχέση με την ικανότητα ενός οργανισμού να επιτελέσει τις απαραίτητες λειτουργίες προκειμένου να καταστεί εφικτή η ανάπτυξη και επιβίωσή του.

Η περιοχή επίδρασης ενός παράγοντα καταπόνησης στην ανάπτυξη ενός οργανισμού συνιστά το "νόμο του ελαχίστου", ο οποίος διατυπώθηκε από το Γερμανό χημικό Justus von Liebig (1840). Ο νόμος αναφέρεται στην απαίτηση ενός ελαχίστου ορίου για ένα συγκεκριμένο παράγοντα, εντός του οποίου ο οργανισμός δύναται να επιτελέσει τις απαραίτητες λειτουργίες προκειμένου να καταστεί εφικτή η απρόσκοπτη ανάπτυξή του.

Σύμφωνα με τις επιπτώσεις που επιφέρουν, οι πλέον σημαντικές αβιοτικές καταπονήσεις είναι :

1. Έλλειψη νερού, που μπορεί να προκληθεί από ξηρασία, αλατότητα, υψηλή θερμοκρασία και παγετό
2. Αυξημένη αλατότητα
3. Περίσσεια νερού, που μπορεί να προκαλέσει ανοξία (anoxia) ή υποξία (hypoxia)
4. Οξειδωτικό στρες – Συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS)
5. Ακραίες Θερμοκρασίες (χαμηλές ή υψηλές)
6. Αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων

Σύμφωνα με αναφορές, οι προαναφερθείσες καταπονήσεις προκαλούν μείωση της μέσης απόδοσης των σημαντικότερων καλλιεργούμενων φυτών, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% (Wang et al., 2003).

Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις δημιούργησαν συνθήκες ισχυρής επιλεκτικής πίεσης, προκαλώντας πληθώρα μεταβολών σε μοριακό, βιοχημικό, φυσιολογικό και μορφολογικό επίπεδο, που συνετέλεσαν στην ανάπτυξη, μέσω της εξελικτικής διαδικασίας, μηχανισμών προσαρμογής και επιβίωσης υπό τις δυσμενείς συνθήκες. Στο σύνολό τους, οι ποικίλες στρατηγικές προσαρμογής των φυτών σε καταπονήσεις περιλαμβάνουν την πρόσληψη και τη μεταγωγή του περιβαλλοντικού σήματος και τη μετέπειτα ενεργοποίηση μηχανισμών ανοχής προκειμένου να προσαρμοστούν στην επικρατούσα καταπόνηση (Schützendübel and Polle, 2002). Οι μεταβολές αυτές είναι είτε παροδικές, οπότε προκαλούν αντιστρέψιμες τροποποιήσεις στο φαινότυπο, ή μόνιμες, οπότε είναι κληρονομήσιμες στις επόμενες γενεές.

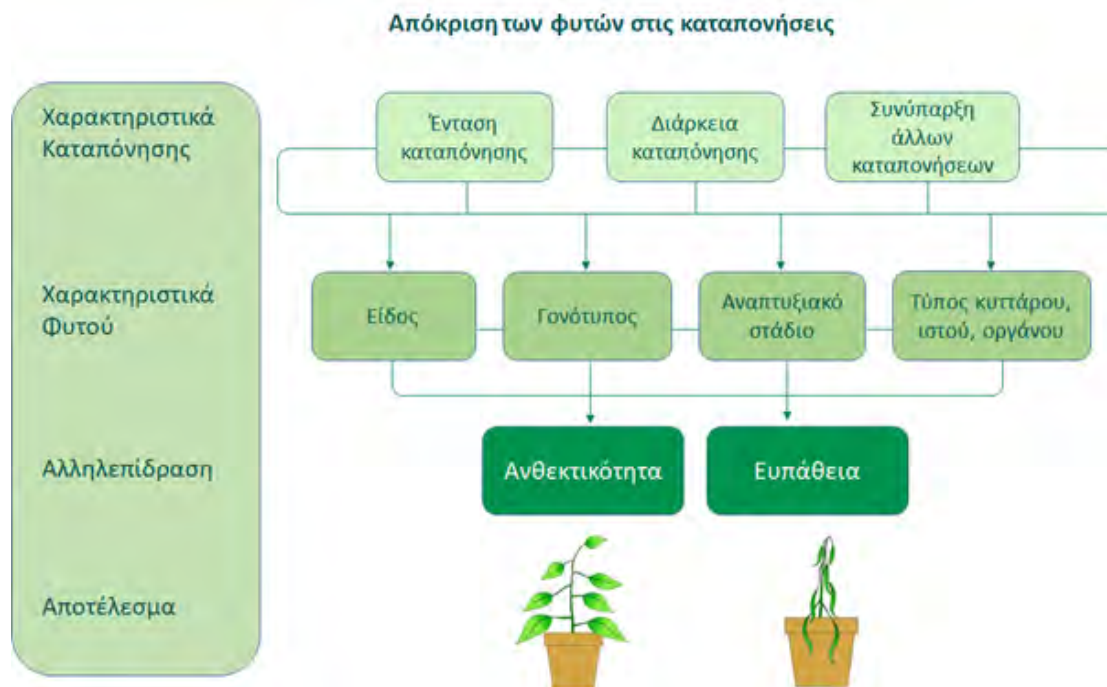
Η κατανόηση των οδών σήμανσης και ανοχής των φυτών είναι θεμελιώδους σημασίας τόσο σε επίπεδο βασικής όσο και σε επίπεδο εφαρμοσμένης έρευνας καθώς αποτελούν το θεμέλιο λίθο για την αποτελεσματική και στοχευμένη βελτίωση των φυτών έναντι καταπονήσεων.

1.6 Στάδια απόκρισης του φυτού σε αβιοτικές καταπονήσεις

Σύμφωνα με αναφορές στη βιβλιογραφία (FAO, 2007), μόνο το 3,5% της παγκόσμιας έκτασης δεν υπόκειται σε περιβαλλοντικούς περιορισμούς για την ανάπτυξη και παραγωγικότητα των καλλιεργειών. Έτσι, καθίσταται προφανές ότι οι αβιοτικές καταπονήσεις εξακολουθούν να έχουν δυσμενείς επιδράσεις στα φυτά ως προς το δυναμικό παραγωγής και τη δυνατότητα επιβίωσής τους. Ταυτόχρονα, η επερχόμενη κλιματική αλλαγή, η ραγδαία μείωση των διαθέσιμων πόρων αλλά και η προοδευτική υποβάθμιση των εδαφών, που επιφέρει συνεχή μείωση της καλλιεργήσιμης γης, αναμένεται να εντείνουν τα προβλήματα που ανακύπτουν από αβιοτικές καταπονήσεις (Cramer et al., 2011). Τα ανωτέρω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι βασικό πυλώνα των σύγχρονων αειφορικών συστημάτων καλλιέργειας συνιστά η μείωση των χρησιμοποιούμενων εισροών, καθιστούν αναγκαία τη δημιουργία ποικιλιών με αναβαθμισμένη ανθεκτικότητα και σταθερότητα της απόδοσης υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Η επίτευξη του στόχου αυτού, προϋποθέτει την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν το γνώρισμα της ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων αλλά και τη δημιουργία κατάλληλων μεθόδων για την ευχερή επιλογή των επιθυμητών ανθεκτικών γονοτύπων.

Η απόκριση των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης διαμορφώνεται συναρτήσει διαφόρων παραγόντων συμπεριλαμβανομένου του φυτικού είδους αλλά και του γονότυπου εντός του ίδιου είδους. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης παράγοντες όπως η γενικότερη υγεία του φυτού, το φυτικό ιστό ή όργανο που πλήττεται από το στρες καθώς και το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο λαμβάνει χώρα η καταπόνηση. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί πως ένα φυτό μπορεί να παρουσιάσει φαινότυπο ανθεκτικότητας σε ένα στάδιο ανάπτυξης σε ένα παράγοντα καταπόνησης, ενώ στην ίδια καταπόνηση σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο να χαρακτηριστεί ως ευαίσθητο.

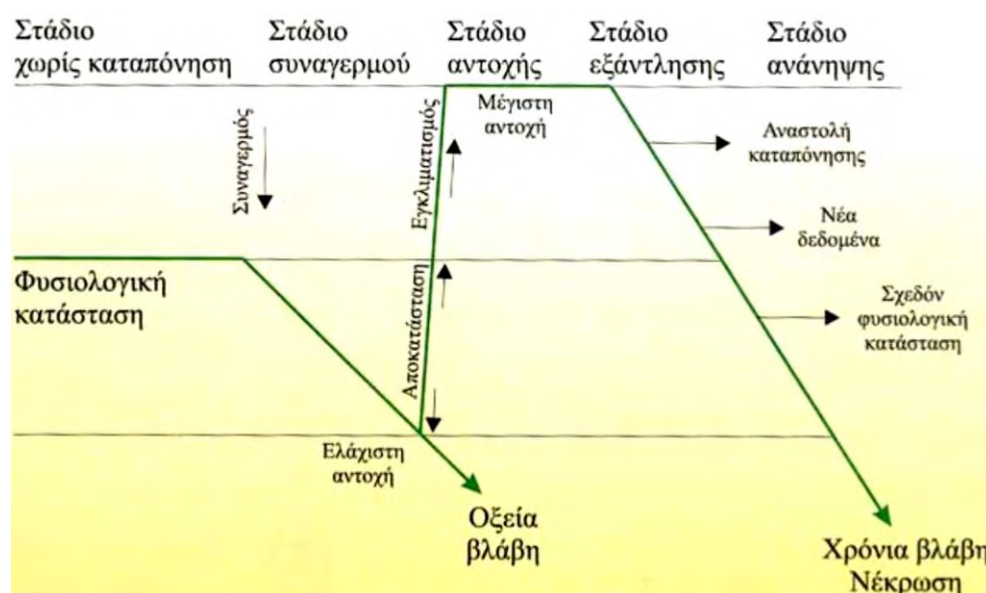
Είναι προφανές ότι καθοριστικής σημασίας είναι οι συνιστώσες της καταπόνησης *per se*, όπως η διάρκεια, η συχνότητα και η ένταση της έκθεσης αλλά και η ταυτόχρονη επικράτηση πέραν του ενός στρεσογόνων παραγόντων κατά την ίδια χρονική στιγμή και στο ίδιο περιβάλλον (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Απόκριση των φυτών στις καταπονήσεις. Η αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού και παράγοντα καταπόνησης εξαρτάται από παράγοντες που σχετίζονται με το φυτό και με την καταπόνηση *per se*. (Πηγή: ΜΔΕ Ζιάννα Ε, 2018)

Τα στάδια από τα οποία διέρχεται ένα φυτό προκειμένου να προσαρμοστεί και να επιβιώσει υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες περιλαμβάνουν μία σειρά βιοχημικών και μοριακών διεργασιών που αποσκοπούν στην αντίληψη του ερεθίσματος, τη μεταγωγή του σήματος και τελικά την ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας (Εικόνα 1.10). Ειδικότερα, το πρώτο εμπειρικό στάδιο είναι η φάση του συναγερμού που ξεκινά από την εμφάνιση της καταπόνησης και αφορά σε τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε μεταβολικό επίπεδο. Στη φάση αυτή, πραγματοποιείται η ανίχνευση και η ενεργοποίηση του υποδοχέα (πλασματική μεμβράνη, ABA, πρωτεϊνικές κινάσες) και στη συνέχεια, σημειώνεται η δημιουργία δευτερευόντων αγγελιοφόρων (ROS, αγγελιοφόροι σήματος που προέρχονται από λιπίδια, φωσφοπρωτεΐνες) που μεταφράζουν το εξωτερικό σήμα και οδηγούν στην πρόκληση διάφορων αλλαγών στη φυσιολογία του φυτού (Gong et al., 2013). Τα κύρια δίκτυα σηματοδότησης για την καταπόνηση από βαρέα μέταλλα, θεωρείται σύμφωνα με τους (Hirayama and Kazuo, 2010; Jalimi et al., 2018) πως είναι η σηματοδότηση Ca, ορμονών και MAPK. Το δεύτερο στάδιο είναι αυτό της ανοχής, όπου

επιτελείται μια αναδιάταξη της λειτουργίας των μηχανισμών του φυτού με σκοπό τον εγκλιματισμό, την προσαρμογή και την επιδιόρθωση τυχόν βλαβών που προκλήθηκαν από την καταπόνηση (Duque et al., 2013). Το αμέσως επόμενο στάδιο είναι η φάση της εξάντλησης, κατά την οποία το φυτό αδυνατεί να ανταπεξέλθει και να προσαρμοστεί στους παράγοντες καταπόνησης και οδηγείται σε χρόνια βλάβη των κυττάρων και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Τέλος, λαμβάνει χώρα το στάδιο της αναγέννησης ή ανάκαμψης, κατά το οποίο πραγματοποιείται μερική ή ολική επαναφορά και αναγέννηση των φυσιολογικών λειτουργιών. Η φάση αυτή ενεργοποιείται υπό την προϋπόθεση ότι έχει απομακρυνθεί ο στρεσογόνος παράγοντας και οι βλάβες που έχει υποστεί το φυτό είναι αναστρέψιμες (Lichtenthaler, 1996).



Εικόνα 1.10: Στάδια απόκρισης των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης. (Πηγή: “Φυσιολογία Φυτών – από το μόριο στο περιβάλλον”, επιμέλεια Κ.Α. Ρουμπελάκη- Αγγελάκη, 2003)

1.7 Μηχανισμοί αντοχής έναντι αβιοτικών καταπονήσεων

Προκειμένου να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν έναντι των αντίξωων περιβαλλοντικών συνθηκών από τις οποίες πλήττονται καθημερινά, οι φυτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει πληθώρα μηχανισμών άμυνας. Οι τελευταίοι, συνιστούν το αποτέλεσμα συνεξέλιξης με το περιβάλλον το οποίο ασκεί ισχυρή επιλεκτική πίεση λόγω των αρνητικών επιπτώσεων των επικρατούντων συνθηκών. Προς την κατεύθυνση αυτή, τα ευρήματα ολοένα και περισσότερων

ερευνών συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι τα φυτά θυμούνται, απομνημονεύουν και επεξεργάζονται εμπειρίες και χρησιμοποιούν αυτές τις πληροφορίες για την προσαρμοστική τους συμπεριφορά και εξέλιξη (Trewavas, 2003).

Οι μηχανισμοί αυτοί διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: i) αποφυγής (escape), ii) διαφυγής (avoidance) και iii) αντοχής (tolerance). Οι μηχανισμοί αποφυγής αφορούν σε διεργασίες και κατασκευές μέσω των οποίων το φυτικό είδος αποφεύγει την επαφή με τον παράγοντα καταπόνησης (Shah et al., 2017). Η αποφυγή επιτυγχάνεται με δύο τρόπους, είτε με την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου πριν την εμφάνιση και έκθεση στην καταπόνηση είτε με την είσοδο σε φάση ληθάργου μόλις εμφανιστεί η καταπόνηση. Οι μηχανισμοί διαφυγής αφορούν σε λειτουργίες του φυτού που αποσκοπούν στην ελαχιστοποίηση της έκθεσης και τελικά τη μείωση της επίδρασης της αβιοτικής καταπόνησης στις κυτταρικές λειτουργίες του φυτού. Τέλος, οι μηχανισμοί αντοχής επιτρέπουν την προσαρμογή του φυτού υπό αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, χωρίς να απειλείται άμεσα η επιβίωσή του.

Οι φυτικοί οργανισμοί έχουν την δυνατότητα να μεταβάλλουν τον φαινότυπό τους, σε απόκριση διάφορων αλλαγών του περιβάλλοντος. Το φαινόμενο της ποικίλης προσαρμοστικής συμπεριφοράς, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται, στη διάρκεια ζωής των φυτών αποδίδεται με τον όρο "φαινοτυπική πλαστικότητα". Η προσαρμοστική συμπεριφορά των φυτών, αλλά και των ζώων, έχει εξελιχθεί ως μέσο βελτιστοποίησης του αναπαραγωγικού τους δυναμικού (fitness). Η επίτευξη του στόχου αυτού από μέρους των φυτών απαιτεί την πρόσβαση σε μία "εσωτερική μνήμη" που προσδιορίζει το άριστο οικολογικό εύρος στο οποίο επιτυγχάνεται μεγιστοποίηση του παραγωγικού δυναμικού, με το τελευταίο να αφορά συνήθως στο μέγιστο αριθμό βιώσιμων σπόρων. Εκτός του άριστου οικολογικού εύρους, η πλαστικότητα στην αύξηση και ανάπτυξη παρεμβαίνει ως μέσο εξισορρόπησης και ανάκαμψης ώστε να προσεγγιστεί κατά το δυνατό περισσότερο το μέγιστο δυναμικό ανάπτυξης και αναπαραγωγής. Μέσου αυτού του προσεγγιστικού μηχανισμού, επιτυγχάνεται μείωση του χάσματος μεταξύ άριστου και μη άριστου οικολογικού εύρους (Trewavas, 2003).

Αναφορικά με τους μηχανισμούς αντοχής, αυτοί κατηγοριοποιούνται σε τρεις κατηγορίες:

- Εγγενείς (constitutive)
- Προσαρμογής (adaptive)

- Εγκλιματισμού (acclimation)

Οι εγγενείς μηχανισμοί αναφέρονται σε γνωρίσματα του φυτού που παρουσιάζουν έντονη γονοτυπική εξάρτηση και δομική έκφραση. Οι μηχανισμοί προσαρμογής είναι αποκρίσεις του φυτού που διαμορφώνονται έπειτα από μακροχρόνια έκθεση σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και, όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν το αποτέλεσμα δράσης της φυσικής επιλογής. Όσον αφορά τους μηχανισμούς εγκλιματισμού, πρόκειται για γρήγορες επίκτητες αλλαγές κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου του φυτού, οι οποίες λαμβάνουν χώρα ως απόκριση σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και αποσκοπούν στη διατήρηση της ομοιόστασης σε κυτταρικό επίπεδο.

1.8 Καταπόνηση από αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων

1.8.1 Βαρέα μέταλλα

Ο επιταχυνόμενος ρυθμός εκβιομηχανοποίησης, η εντατικοποίηση της γεωργίας, η αλόγιστη χρήση φυτοφαρμάκων και ειδικότερα φωσφορικών λιπασμάτων, σε συνδυασμό με τον αυξανόμενο ρυθμό της αστικοποίησης, έχουν προκαλέσει τη μείωση των διαθέσιμων πόρων καθώς και την πρόκληση σοβαρής χημικής ρύπανσης των εδαφών και υδάτων με αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων. Οι παράγοντες αυτοί συντελούν στη συνεχώς εντεινόμενη περιβαλλοντική ρύπανση, η οποία επηρεάζει δυσμενώς την ποιότητα της υδρόσφαιρας, ριζόσφαιρας, ατμόσφαιρας, λιθόσφαιρας και βιόσφαιρας. Η συνεχώς αυξανόμενη συσσώρευση βαρέων μετάλλων αποτελεί παγκόσμιο ζήτημα υψίστης σημασίας καθώς τα μέταλλα συνιστούν επικίνδυνους ρύπους για το περιβάλλον, την παραγωγικότητα των καλλιεργειών αλλά την ανθρώπινη υγεία.

Τα βαρέα μέταλλα ορίζονται ως μια ομάδα μεταλλικών και μεταλλοειδών κατιόντων με ατομικό βάρος από 63,54 έως 200,59 και ατομική πυκνότητα μεγαλύτερη από 5 gcm^{-3} (Schützendübel and Polle, 2002). Είναι ανόργανες χημικές ενώσεις με ατομικό αριθμό πάνω από 20, ενώ είναι τοξικά ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις προκαλώντας μεταβολές σε κυτταρικό, μορφολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο.

Στην ομάδα των βαρέων μετάλλων συγκαταλέγονται στοιχεία όπως ο μόλυβδος (Pb), το κάδμιο (Cd), το νικέλιο (Ni), ο σίδηρος (Fe), ο ψευδάργυρος (Zn), το χρώμιο (Cr) και το νικέλιο (Ni) κ.λπ. Διακρίνονται δύο κατηγορίες: i) βασικά μικροθρεπτικά συστατικά (Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Ni), τα οποία αν και απαραίτητα σε μικρές συγκεντρώσεις για την ομαλή ανάπτυξη και αύξηση των φυτών, αποβαίνουν τοξικά όταν η συγκέντρωσή τους υπερβαίνει ένα συγκεκριμένο όριο και ii) μη βασικά στοιχεία, τα οποία είναι τοξικά ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Cd, Sb, Cr, Pb, As, Ag, Se) (Verkleij and Schat, 1989).

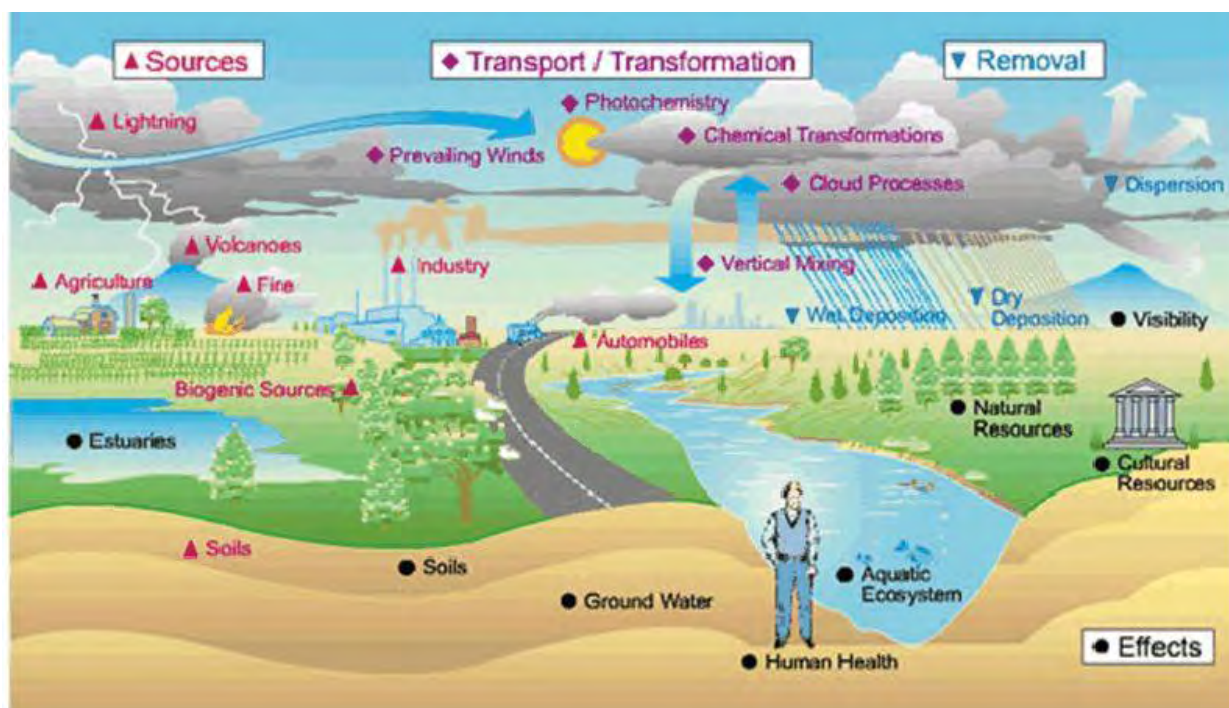
Επιπρόσθετα, τα βαρέα μέταλλα είναι μεταλλικές ενώσεις που έχουν την ικανότητα να βιοσυσσωρεύονται και να μην αποδομούνται ή να μεταβολίζονται, γεγονός που εντείνει το πρόβλημα απόθεσής τους στο περιβάλλον. Τα φυλλώδη λαχανικά έχει βρεθεί πως έχουν την ικανότητα να απορροφούν τις μεγαλύτερες ποσότητες βαρέων μετάλλων συγκριτικά με άλλα είδη λαχανικών (Zhou et al., 2016). Αυτά με την σειρά τους συσσωρεύονται σε ιστούς και βρώσιμα μέρη των φυτών με αποτέλεσμα να μεταφέρονται στην τροφική αλυσίδα και μέσω αυτής στους καταναλωτές, προκαλώντας επιζήμιες επιπτώσεις στην υγεία των τελευταίων (Singh et al., 2012).

1.8.2 Πηγές μόλυνσης

Οι πηγές χημικής ρύπανσης του περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα είναι ποικίλης προέλευσης και αφορούν κυρίως σε φυσικές, γεωργικές, βιομηχανικές και οικιακές. Εκ πρώτης, τα βαρέα μέταλλα προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον και συγκεκριμένα από τη γεωχημεία του φλοιού της Γης. Η συγκέντρωση και η σύνθεσή τους εξαρτώνται από τον τύπο του εκάστοτε ορυκτού και από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Αναφορικά με τις γεωργικές πηγές, τα βαρέα μέταλλα εναποτίθενται στα εδάφη μέσω της μη ορθολογικής χρήσης ανόργανων και οργανικών λιπασμάτων, ιδιαίτερα των φωσφορικών, εντομοκτόνων, παρασιτοκτόνων και μυκητοκτόνων προκαλώντας αύξηση της συγκέντρωσης των Cd, Cr, Ni, Pb και Zn (Blogger 2014). Ακόμη η χρήση ουσιών όπως ο ασβέστης, το μαγνήσιο, η ζωική κοπριά και η ιλύς βιολογικού καθαρισμού, που χρησιμοποιούνται ως εδαφοβελτιωτικά, έχει βρεθεί πως οδηγεί σε αυξημένη συσσώρευση βαρέων μετάλλων, όπως Mn, Zn, Cu και Cd, τα οποία συσσωρεύονται συνήθως στα ανώτερα εδαφικά στρώματα 0-15 cm (Yanqun et al., 2005; Singh et al., 2012).

Σχετικά με τις βιομηχανικές πηγές, σημαντική εναπόθεση βαρέων μετάλλων προκαλούν η εξόρυξη, η τήξη, η καύση πετρελαίου, οι μονάδες καύσης άνθρακα, οι σταθμοί ηλεκτροπαραγωγής καθώς οι βιομηχανίες επεξεργασίας πλαστικών και χαρτιού (Onder et.al., 2007)). Τα βαρέα μπορούν να μεταφερθούν στα εδάφη είτε με απλή επαφή από τους χώρους εξόρυξης και βιομηχανοποίησης ή μετά από το σχηματισμό και την πρόκληση αερολυμάτων, τα οποία με την σειρά τους ρυπαίνουν τα εδάφη μέσω του αέρα (ξηρή απόθεση) ή της βροχής (υγρή απόθεση). Επίσης, τα οικιακά απόβλητα συνιστούν κύρια πηγή ρύπανσης σε ποτάμια και λίμνες, καθώς έχει βρεθεί πως τα οικιακά απορρυπαντικά περιέχουν ιχνοστοιχεία όπως Fe, Mn Cr, Zn Sr και B (Gill, 2014).

Τέλος, στην περιβαλλοντική ρύπανση συντελούν πρόσθετες πηγές, όπως η καύση απορριμμάτων, οι χώροι υγειονομικής ταφής και οι ρύποι από τη συνεχή χρήση των μέσων μαζικής μεταφοράς που καίνε βενζίνη με μόλυβδο (αυτοκίνητα, βενζινοκίνητα και πετρελαιοκίνητα οχήματα, αεροπλάνα) (Onder et.al., 2007).



Εικόνα 1.11: Πηγές χημικής ρύπανσης από βαρέα μέταλλα, τρόποι μεταφοράς και απόθεσης και δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον (Πηγή: Blogger 2014).

Τα βαρέα μέταλλα για να θεωρηθούν βιολογικά σημαντικά θα πρέπει να είναι βιοδιαθέσιμα στα φυτά. Οι κύριες ιδιότητες των βαρέων μετάλλων, όπως η κινητικότητα, η βιοδιαθεσιμότητα, η ικανότητα ή όχι ιονισμού αλλά και η απελευθέρωση από τα κολλοειδή του εδάφους, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη μορφή και το είδος του μετάλλου αλλά και από τις ιδιότητες του εδάφους (Pereira et al., 2011). Οι εδαφικές ιδιότητες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των βαρέων μετάλλων είναι οι εξής:

- pH εδάφους
- ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (ΙΑΚ)
- περιεκτικότητα και είδος οργανικής ύλης
- περιεκτικότητα σε άργιλο
- δυναμικό οξειδοαναγωγής
- παρουσία ανθρακικών αλάτων
- παρουσία άλλων στοιχείων

1.8.3 Επιπτώσεις των βαρέων μετάλλων στα φυτά

Η παρουσία των βαρέων μετάλλων στα καλλιεργούμενα εδάφη και η επακόλουθη έκθεση των φυτών σε υψηλά και τοξικά επίπεδα αυτών, προκαλεί ένα σύνολο από διάφορες φυσιολογικές και βιοχημικές αποκρίσεις καθώς και αλλοιώσεις σε κύτταρα και ιστούς των φυτών. Είναι αξιοσημείωτο ωστόσο, ότι το εκάστοτε βαρύ μέταλλο ενεργεί κατασταλτικά σε διαφορετικές διεργασίες στα φυτικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να προκαλούνται διαφορετικές αποκρίσεις που καθορίζονται από τον τύπο του μετάλλου και το φυτικό είδος/γονότυπο. Ωστόσο, οι περισσότερες κοινές τοξικές επιδράσεις συνδέονται με ισχυρή και ταχεία αναστολή των διεργασιών της ανάπτυξης των υπέργειων και υπόγειων φυτικών τμημάτων με επακόλουθη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και αύξησης, χλώρωση των φύλλων, συρρίκνωση των ριζών, μείωση της βιομάζας και της παραγωγικότητας, επιτάχυνση της γήρανσης και επερχόμενο κυτταρικό θάνατο (Gill., 2014).

Πρόσθετη κοινή επίπτωση της τοξικότητας από βαρέα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένου αυτής που προκαλείται από αυξημένη συγκέντρωση καδμίου, είναι η οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από υπερσυσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species), δηλαδή ελεύθερων ριζών οι οποίες είναι βραχύβιες και εξαιρετικά δραστικές, όπως αυτές του υδροξυλίου (OH^\cdot),

υπεροξειδίου (O_2) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Gill and Tuteja., 2010). Σε αντίθεση με τα οξειδοαναγωγικά-ενεργά μέταλλα, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, τα βαρέα μέταλλα, όπως Pb, Cd, Ni, Al, Mn and Zn, δεν έχουν την ικανότητα άμεσης παραγωγής ROS μέσω συμμετοχής σε βιολογικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις τύπου Haber Weiss/Fenton (Shahid et al., 2014). Ωστόσο, προκαλούν την παραγωγή ROS μέσω διαφορετικών έμμεσων μηχανισμών, όπως η επαγωγή της δραστηριότητας των NADPH οξειδασών, η απομάκρυνση απαραίτητων κατιόντων από ειδικές περιοχές σύνδεσης ενός ενζύμου (πχ καταλυτικό κέντρο ενζύμου) και η καταστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι ROS παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων, ενώ παράλληλα συμμετέχουν στη ρύθμιση διαφόρων βασικών λειτουργιών, όπως αυτές του κυτταρικού κύκλου, της ανάπτυξης, της απόκρισης σε αβιοτικές καταπονήσεις, της μεταγωγής σήματος, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και της άμυνας έναντι παθογόνων. Ωστόσο, η υπερσυσσώρευσή τους, λόγω καταπόνησης από την τοξικότητα βαρέων μετάλλων, έχει δυσμενείς επιπτώσεις στο εσωτερικό αντιοξειδωτικό σύστημα των κυττάρων και προκαλεί οξειδωτικό στρες.

Υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, τα κύτταρα παρουσιάζουν ποικίλα συμπτώματα τοξικότητας σε χημικό, βιολογικό και φυσιολογικό επίπεδο, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των βιομορίων με τα ROS (Shahid et al., 2014). Τα τελευταία, προκαλούν αλλοιώσεις και βλάβες στην δομή των λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων (υπεροξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών) καθώς και των νουκλεϊκών οξέων, διαταράσσοντας την ομαλή λειτουργία βασικών μετάλλων (Azevedo et al., 2012) αλλά και την ισορροπία μεταξύ της οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ομοιόστασης (Gill and Tuteja, 2011).

Επίσης, τα βαρέα μέταλλα επηρεάζουν δυσμενώς την πλασματική μεμβράνη, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα και τη λειτουργία της φωτοσυνθετικής συσκευής (Hassanein et al., 2013), της αναπνοής, της διαπνοής και άλλων ενζυματικών δραστηριοτήτων καθώς και άλλων λειτουργικών ομάδων των κυττάρων που είναι απαραίτητες για την ομαλή λειτουργία του φυτού (Yang and Chu, 2011). Τέλος, πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι η τοξικότητα των μετάλλων παρεμποδίζει την ομαλή πρόσληψη και αξιοποίηση των διαφόρων θρεπτικών συστατικών, όπως Fe, Mn, P, K, λόγω της ανταγωνιστικής δράσης των βαρέων μετάλλων με τα στοιχεία αυτά (Monteiro et al., 2008).

1.8.4 Κάδμιο (Cd)

Το κάδμιο είναι ένα μεταλλικό στοιχείο, με ελαφρύ λευκό χρώμα, που ανήκει στην ΙΒ ομάδα του περιοδικού πίνακα, δηλαδή στα στοιχεία μετάπτωσης. Έχει ατομικό αριθμό (Z)=48, πυκνότητα μεγαλύτερη από 5 g/ml και ατομική μάζα 112.41 g (Bagheri et al., 2014). Δεν αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για τα φυτά και είναι ιδιαίτερα τοξικό, ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις, τόσο για τους φυτικούς οργανισμούς όσο και για τους ανθρώπους. Συγκεκριμένα, αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς ρύπους και ταξινομείται ανάμεσα στους 20 πιο επικίνδυνους (Gill and Tuteja, 2011).

Τα τελευταία χρόνια, η συνδυασμένη δράση της εντατικοποίησης της γεωργίας, της εκβιομηχανοποίησης και της αστικοποίησης οδήγησαν σε συνεχή αύξηση των συγκεντρώσεων καδμίου, φθάνοντας τους 22.000 tn παγκοσμίως (Matraszek et al., 2016). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι το κάδμιο εναποτίθεται στο περιβάλλον σε μια κλίμακα των 660 τόνων ετησίως (Jibril et al., 2017). Το μέταλλο αυτό συνιστά έναν ρύπο με μακρύ βιολογικό κύκλο ζωής που διαλύεται εύκολα στο νερό και είναι αρκετά βιοδιαθέσιμο στα φυτά. Το ρυθμιστικό όριο του καδμίου στο έδαφος είναι 100 mg/Kg εδάφους (Gill, 2014).

Το κάδμιο εμφανίζεται στα περισσότερα εδάφη με αριθμό οξείδωσης +2 και με την μορφή Cd^{2+} και συσχετίζεται με κolloειδή του εδάφους, με αποτέλεσμα να υπάρχει σε μεγάλη αναλογία (Kabata-Pendias and Arun, 2007). Η πρόσληψη του καδμίου από τα φυτά εξαρτάται από το pH του εδάφους, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, την οργανική ύλη αλλά και από την παρουσία άλλων μετάλλων όπως είναι ο Zn, Fe, Cu και Ca (Pereira et al., 2011). Σε υψηλές συγκεντρώσεις, προκαλεί βιοχημικές, μορφολογικές και φυσιολογικές δυσλειτουργίες, επαγωγή οξειδωτικής καταπόνησης καθώς και εμφανή τοξικά συμπτώματα, όπως χλώρωση των φύλλων, καχεκτική ανάπτυξη και πρόωρη γήρανση (Alves et al., 2017).

Ως προς την ανθρώπινη υγεία, το κάδμιο θεωρείται ένας από τους πιο επιβλαβείς ρύπους καθώς συσσωρεύεται και διατηρείται ενεργό στο ανθρώπινο σώμα, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αθροιστική δράση όταν η συσσώρευσή του υπερβεί ένα συγκεκριμένο όριο. Το κάδμιο πρώτα συσσωρεύεται στα φυτά, και ιδιαίτερα στα βρώσιμα μέρη, και μεταφέρεται στον καταναλωτή διαμέσου της τροφικής αλυσίδας προκαλώντας μια σειρά από τοξικές επιδράσεις (Azevedo et al., 2012). Τα αποτελέσματα ερευνών σχετικά με τις επιδράσεις του καδμίου αποδεικνύουν ότι είναι τοξικό για τους νεφρούς και προκαλεί οξεία τοξικότητα στο ήπαρ. Επιπρόσθετα, αναφέρεται ότι

δημιουργεί οστεοτοξικότητα και κατάρρευση του ανοσοποιητικού συστήματος (Hang et al., 2016). Τέλος, συνιστά τον πλέον υπεύθυνο ρύπο για την πρόκληση καρκίνου του πνεύμονα από τα αερολύματα αλλά και από το τσιγάρο. Στο σύνολό τους, τα ευρήματα των σχετικών μελετών καταδεικνύουν την επικινδυνότητα του καδμίου για το περιβάλλον, και συγκεκριμένα το έδαφος και τον υδροφόρο ορίζοντα, για τις καλλιέργειες αλλά και για την ανθρώπινη υγεία (Akhter, 2012).

1.8.5 Ψευδάργυρος (Zn)

Ο ψευδάργυρος είναι ένα μεταλλικό στοιχείο που έχει παρόμοιες χημικές ιδιότητες με αυτές του καδμίου. Ειδικότερα, ανήκει και αυτός στην IIB ομάδα του περιοδικού πίνακα, δηλαδή στα στοιχεία μετάπτωσης. Έχει ατομικό αριθμό (Z) 30, πυκνότητα 7,14 g/cm³, σημείο τήξεως 420 °C και σημείο βρασμού 907 °C (National Pollutant Inventory). Αποτελεί ένα βασικό μικροθρεπτικό στοιχείο, απαραίτητο για την ομαλή λειτουργία των φυτών, ζώων και των ανθρώπων, διότι αποτελεί δομικό συστατικό για μεγάλο αριθμό ενζύμων, πεπτιδασών, πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα δρα ως καταλύτης ενζυμικών αντιδράσεων και έχει ενεργή συμμετοχή σε μεταβολικές διεργασίες. Έχει βρεθεί ότι περισσότερες από 1200 πρωτεΐνες περιέχουν ή συνδέουν ψευδάργυρο, γεγονός που υποδηλώνει τον πολυδιάστατο ρόλο του στους οργανισμούς (Lucini and Letizia, 2015). Ωστόσο, οι υψηλές συγκεντρώσεις Zn αποβαίνουν τοξικές, προκαλώντας αναστολή της αύξησης και ανάπτυξης, ορατά τοξικά συμπτώματα, όπως χλώρωση των φύλλων, και πρόωρη γήρανση (Gill, 2014), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις σημειώνεται οξειδωτικό στρες.

Η συσσώρευσή του στο περιβάλλον προκύπτει από την αλόγιστη χρήση φυτοφαρμάκων, εντομοκτόνων και λιπασμάτων καθώς και από οικιακές χρήσεις. Ακόμη βρίσκεται σε γαλβανισμένα μέταλλα αλλά και σε κράματα χαλκού. Στο έδαφος εμφανίζεται με την μορφή Zn²⁺ και, όπως και το κάδμιο, έχει μακρά βιολογική ζωή. Συγκριτικά με το κάδμιο, ο ψευδάργυρος έχει μικρότερη κινητικότητα και είναι λιγότερο βιοδιαθέσιμος στα φυτά (Antoniadis et al., 2015). Επίσης, τα αποτελέσματα ερευνών υποδεικνύουν ότι, σε υψηλές συγκεντρώσεις σε βλαστούς και ρίζες, ο Zn παρουσιάζει ανταγωνιστική δράση και μειώνει τη βιοθεσιμότητα άλλων στοιχείων, όπως Fe, Mn, Cu. Η συγκέντρωση 150-300 mg/kg εδάφους θεωρείται τοξική (Sagardoy et al., 2009).

1.9 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των βαρέων μετάλλων

Τα φυτά διαθέτουν ένα πολύπλοκο δίκτυο που απαρτίζεται από διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς, τόσο μόνιμους όσο και επαγόμενους, για την αντιμετώπιση της τοξικότητας των μεταλλικών ιόντων, με το αμυντικό σύστημα να απαρτίζεται από ενζυματικές και μη ενζυματικές αντιοξειδωτικές διεργασίες.

Στους μόνιμους μηχανισμούς, περιλαμβάνονται διάφορες μορφολογικές δομές των φυτών, όπως το μεγάλο πάχος της εφυμενίδας, της επιδερμίδας ή του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο θεωρείται και ως η πρώτη θέση ανίχνευσης των βαρέων μετάλλων. Επιπρόσθετα, η παρουσία τριχιδίων διαδραματίζει κεντρικό ρόλο εφόσον μπορούν να λειτουργήσουν ως χώροι αποθήκευσης και πρόσδεσης των βαρέων μετάλλων λόγω του αρνητικού τους φορτίου (Dal Corso et al., 2010). Ακόμη, η ύπαρξη κήρων καθώς και η μυκκοριζική συμβίωση των ριζών, μπορεί να λειτουργήσουν ως φράγμα στην πρόσληψη μεταλλικών ιόντων, με επακόλουθη την αποφυγή της εμφάνισης της τοξικότητας (Emamverdian et al., 2015).

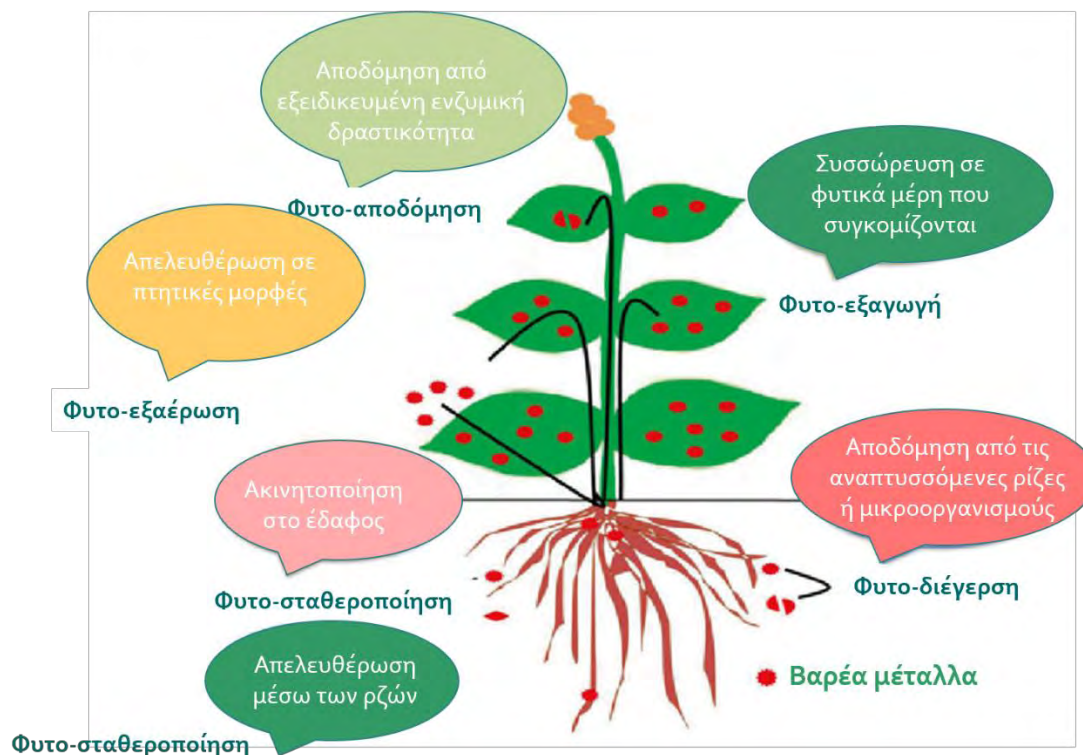
Πέραν του πρωτογενούς αμυντικού μηχανισμού, που αποσκοπεί στη μείωση της απορρόφησης των βαρέων μετάλλων ή/και την καθοδηγούμενη διοχέτευσή τους στα κύτταρα των ριζών, τα φυτά διαθέτουν πρόσθετους μηχανισμούς που αποσκοπούν στη μείωση των επιπτώσεων των βαρέων μετάλλων. Εφόσον τα μεταλλικά ιόντα υπερνικήσουν τα δομικά εμπόδια από μέρους των φυτών και διεισδύσουν στο εσωτερικό των κυττάρων, ενεργοποιούνται οι δευτερογενείς μηχανισμοί άμυνας οι οποίοι περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων, την πρόσδεση των βαρέων μετάλλων από φυτοχελατίνες, τη γλουταθειόνη, ορισμένα αμινοξέα και μεταλλοδεσμευτικά πεπτίδια. Οι μηχανισμοί αυτοί συγκαταλέγονται στην επαγόμενη άμυνα των φυτών και ενεργοποιούνται από την ύπαρξη καταπόνησης, διατηρώντας έτσι τα αποθέματα ενέργειας του φυτού (Karban and Baldwin, 1997).

Τα πρωτογενή και δευτερογενή αμυντικά συστήματα δρουν συνεργιστικά προκειμένου να ανταπεξέλθουν στην αλληλουχία διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά το οξειδωτικό στρες και να εξασφαλίσουν την προστασία των φυτών από τις τοξικές επιδράσεις των ROS (Shahid et al., 2014) (Εικόνα 1.12). Για την προστασία έναντι των τοξικών μεταλλικών ιόντων, τα φυτά έχουν αναπτύξει δύο βασικές στρατηγικές αντιμετώπισης, την **αποφυγή** και την **ανθεκτικότητα**.

1.9.1 Μηχανισμός αποφυγής

Οι μηχανισμοί αποφυγής αποσκοπούν στον έλεγχο και στην αποτροπή διείσδυσης και συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων. Η αποτροπή επιτυγχάνεται είτε μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, είτε μέσω της ρύθμισης αντιδράσεων που διεξάγονται στη ριζόσφαιρα. Ειδικότερα, πραγματοποιείται έκκριση ουσιών από τις ρίζες, όπως είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους -σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα (πχ μηλικό οξύ)- ή υψηλότερου μοριακού βάρους -πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες-, και ακολουθεί χηλικοποίηση των μεταλλικών ιόντων προς τη ριζόσφαιρα. Με τον τρόπο αυτό, επηρεάζεται το μικροβιακό φορτίο στο χώρο της ριζόσφαιρας και αυτό με την σειρά του, δρα ανασταλτικά στην πρόσληψη των βαρέων μετάλλων. Σε ορισμένα φυτά, η στρατηγική αποφυγής της συσσώρευσης των μεταλλικών ιόντων έγκειται στην υψηλή εκλεκτικότητα των κυτταρικών μεμβρανών, η οποία οδηγεί σε αποκλεισμό της εισόδου τοξικών ιόντων. Επιπρόσθετα, η συμβίωση με μυκοριζικούς μύκητες, σύμφωνα με τους Baum et al. (2006), φαίνεται ότι μειώνει τη συσσώρευση των μεταλλικών ιόντων προς όφελος των ξενιστών τους. Η προστασία που παρέχουν οι μυκοριζικοί μύκητες εικάζεται ότι σχετίζεται με τα επίπεδα συσσώρευσης γλουταθειόνης (GSH), καθώς στους συγκεκριμένους σχηματισμούς ανιχνεύθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις της θειόλης (Schutzendubel and Polle, 2002). Οι δράσεις των μυκοριζικών μυκήτων περιλαμβάνουν προώθηση της αύξησης και ανάπτυξης, ακινητοποίηση των μεταλλικών τοξικών ιόντων καθώς και σχηματισμό χηλικών συμπλόκων (Cabral et al., 2015).

Ως προς τις εκκρινόμενες ουσίες από τις ρίζες, αυτές εκκρίνονται είτε με παθητικούς (διάχυση) είτε με ενεργητικούς τρόπους (χρήση μεταφορέων). Ο δεύτερος τρόπος διάχυσης απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, δηλαδή ATP, και για το λόγο αυτό συνδέεται άρρηκτα με την τοξικότητα από τα βαρέα μέταλλα. Ειδικότερα, η έκκριση αυτών των ουσιών είναι ανάλογη με την φωτοσυνθετική συσκευή, η οποία υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα πλήττεται άμεσα δημιουργώντας δυσχέρεια στην έκκριση των προστατευτικών ουσιών. Οι τελευταίες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με τα μεταλλικά ιόντα ή να μεταβάλλουν την χημική συμπεριφορά των μετάλλων, μέσω της μεταβολής του pH του εδαφικού διαλύματος, καθιστώντας αδύνατη την διαθεσιμότητά τους στα φυτά (Antoniadis et al., 2017).



Εικόνα 1.12: Πιθανοί μηχανισμοί απόκρισης των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα.

1.9.2 Μηχανισμός εσωτερικής ανθεκτικότητας

Σε αντίθεση με την στρατηγική του αποκλεισμού, τα φυτά που αποκρίνονται μέσω μηχανισμών ανθεκτικότητας έχουν την ικανότητα συσώρευσης μεγάλων ποσοτήτων βαρέων μετάλλων. Η ανθεκτικότητά τους έγκειται σε μηχανισμούς δέσμευσης και εξουδετέρωσης των τοξικών μεταλλικών ιόντων από εξειδικευμένα μόρια, όπως οργανικά οξέα, φαινολικές ενώσεις και μεταλλοδεσμευτικά πεπτίδια (Emamveridian et al., 2014). Η δέσμευση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία σύμπλοκων με τα μεταλλικά ιόντα, τα οποία διοχετεύονται και απομονώνονται σε μεταβολικά αδρανείς θέσεις, όπως τα κενοτόπια, όπου δεν είναι επιβλαβή για τα φυτικά κύτταρα. Είναι αξιοσημείωτο ωστόσο, ότι οι διεργασίες αυτές παρουσιάζουν έντονη γονοτυπική εξάρτηση, τόσο σε επίπεδο είδους όσο και σε επίπεδο γονοτύπου εντός του είδους, καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση γονοτύπου-περιβάλλοντος ($G \times E$). Οι κύριοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας περιγράφονται παρακάτω:

1. **Διαμερισματοποίηση:** Σε κυτταρικό επίπεδο, τα βαρέα μέταλλα, όπως Cd^{2+} , μπορεί να δεσμευτούν σε μεταβολικά ανενεργές θέσεις, όπως το χυμοτόπιο, το κυτταρικό τοίχωμα, σε ιστούς, ωριμότερα φύλλα ή ακόμη και στην επιδερμίδα προκειμένου να αποφευχθεί η αρνητική επίδραση της τοξικότητας των μεταλλικών ιόντων στα κύτταρα (Durand et al., 2011; Akchter, 2012). Το κυτταρικό τοίχωμα έχει διττό ρόλο καθώς πέραν του ότι λειτουργεί ως φυσιολογικός φραγμός που εμποδίζει την είσοδο των βαρέων μετάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων, λειτουργεί και ως συσσωρευτής μετάλλων διότι περιέχει πολυσακχαρίτες πλούσιους σε καρβοξυλικές ομάδες.
2. **Δέσμευση:** Στο εσωτερικό του κυττάρου, ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων φαίνεται πως παίζει καθοριστικό ρόλο ως προς την ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένου του καδμίου. Στη χηλικοποίηση ιόντων μετάλλων συμμετέχουν ειδικές ενώσεις δέσμευσης -όπως πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους- ή χηλικά μέσα -όπως οργανικά οξέα, γλουταθειόνη, φυτοχηλατίνες, μεταλλοθειονίνες- ακόμη και κυτταρικά εξιδρώματα -όπως φλαβονοειδή, συγκεκριμένα αμινοξέα -όπως προλίνη- και φυτικές ορμόνες -όπως σαλικυλικό οξύ, ιασμονικό οξύ, αιθυλένιο-. Έπειτα από το σχηματισμό τους, τα σύμπλοκα με τα ιόντα μετάλλων, μεταφέρονται και αποθηκεύονται σε μεταβολικά αδρανείς θέσεις, όπως τα κενοτόπια, ενώ ο σχηματισμός αυτός οδηγεί σε καταστολή της ενζυματικής δραστηριότητας και αδρανοποίηση των μετάλλων, με αποτέλεσμα να καθίστανται μη διαθέσιμα για τα φυτά.
 - ο **Φυτοχηλατίνες:** Οι φυτοχηλατίνες είναι μία ομάδα πεπτιδίων πλούσιες σε θειόλη που συντίθενται ενζυματικά υπό συνθήκες καταπόνησης και δη καταπόνησης από βαρέα μέταλλα. Δημιουργούνται στο κυτοσόλιο, ενώ δομικά συστατικά είναι τρία αμινοξέα: γλουταμικό οξύ, κυστεΐνη (αρχικό προϊόν αφομοίωσης του θείου που αυτό με την σειρά του προσδίδει προστασία από την τοξικότητα των μετάλλων) και γλυκίνη. Η γενική τους δομή δίνεται από τον παρακάτω τύπο: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ και όπου $n = 2-11$. Η σύνθεση των φυτοχηλατίνων καταλύεται από το ένζυμο συνθάση της φυτοχηλατίνης που έχει σαν υπόστρωμα τη γλουταθειόνη (GSH), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση από τα βαρέα μέταλλα. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοχή έναντι της τοξικότητας από βαρέα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένου του καδμίου, καθώς συμβάλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης των μεταλλικών ιόντων στα φυτικά

κύτταρα ρυθμίζοντας την διαθεσιμότητά τους. Δημιουργούν ισχυρά σύμπλοκα με τα βαρέα μέταλλα, τα οποία μεταφέρουν, όπως έχει προαναφερθεί, σε μεταβολικά αδρανείς θέσεις. Υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα, σημειώνεται αύξηση της σύνθεσης φυτοχηλατίνων, ενώ η καταπόνηση οδηγεί σε αύξηση της σύνθεσής τους κατά 4-5 φορές περισσότερο (Emamverdian et al., 2014; Schützendübel and Polle, 2002; Gill and Tuteja, 2011; Mickelbar et al., 2015; Yang and Chu, 2011; Bagheri et al., 2014).

- ο Μεταλλοθειονίνες: Είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, χαμηλού μοριακού βάρους, που παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με τις φυτοχηλατίνες, ως προς λειτουργικές ιδιότητες αποτοξίνωσης των μεταλλικών ιόντων (Shaw, 1989). Έχουν βρεθεί σε μια ευρεία γκάμα οργανισμών όπως μύκητες, φυτά, θηλαστικά. Συντίθενται ως αποτέλεσμα μετάφρασης του mRNA, ενώ συγκριτικά με τις φυτοχηλατίνες έχουν την ικανότητα αποτοξίνωσης ευρύτερου φάσματος βαρέων μετάλλων, όπως Cd, Cu, As και Zn. Παράλληλα, σε αυτές αποδίδονται περισσότερες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου της σάρωσης ενεργών μορφών οξυγόνου, επιδιόρθωσης της πλασματικής μεμβράνης και διατήρησης του οξειδοαναγωγικού επιπέδου (Emamverdian et al., 2014).

3. Έκκριση και ταυτόχρονη αποβολή από υπέργεια μέρη των φυτών: Κατά την εξελικτική διαδικασία, ορισμένα φυτά ανέπτυξαν τον μηχανισμό συσσώρευσης αυξημένων ποσοτήτων μεταλλικών ιόντων σε υπέργεια μέρη, με σκοπό την αποβολή τους ώστε να αποφευχθούν οι δυσμενείς επιπτώσεις της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων. Στο πλαίσιο αυτό, παρατηρήθηκε ότι φυτά καπνού υπό συνθήκες καταπόνησης Zn, είχαν την ικανότητα σχηματισμού κρυσταλλικών κόκκων Ca/Zn σε κορυφαία κύτταρα τριχών, οι οποίοι εν συνεχεία οδηγούνταν σε έκκριση και από κύτταρα (Scarret et al., 2016).
4. Αντιοξειδωτικοί παράγοντες: Στην περίπτωση όπου οι προαναφερθείσες στρατηγικές αποφυγής και ανθεκτικότητας δεν επιτυγχάνουν ολοκληρωμένη αντιμετώπιση ή περιορισμό της αρνητικής επίδρασης των βαρέων μετάλλων, προκαλείται μια ανισορροπία των κυτταρικών συστημάτων οξειδοαναγωγής, οδηγώντας σε υπερσυσσώρευση των ενεργών μορφών οξυγόνου. Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες διαχωρίζονται σε ενζυμικούς και μη

ενζυμικούς. Στους ενζυμικούς κατατάσσονται η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης οι οποίοι θεωρούνται περισυλέκτες των ελεύθερων ριζών που είναι προϊόν των ενεργών μορφών οξυγόνου. Στους μη ενζυμικούς, περιλαμβάνονται η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η ανηγμένη γλουταθειόνη, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, οι πολυαμίνες και οι φαινολικές ενώσεις. Οι παράγοντες αυτοί είναι υπεύθυνοι για την εξουδετέρωση των ROS με σκοπό την ομοιόσταση και ισόρροπη παραγωγή και κατανάλωση των ROS. Η ισορροπία αυτή προσδίδει ανθεκτικότητα, εξασφαλίζοντας την ομαλή λειτουργία και ανάπτυξη των φυτών (Schützendübel and Polle, 2002; Gill and Tuteja, 2011; Yang and Chu, 2011; Emamverdian et al., 2014;; Jibril et al., 2017).

Σκοπός της μελέτης

Τις τελευταίες δεκαετίες, η ανθρωπογενής δραστηριότητα, με κύριες συνιστώσες τον επιταχυνόμενο ρυθμό εκ-βιομηχανοποίησης, την αστικοποίηση και την εντατικοποίηση της γεωργίας, έχουν οδηγήσει σε χημική ρύπανση του περιβάλλοντος. Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν τους πλέον επικίνδυνους ρύπους καθώς δεν αποδομούνται αλλά συσσωρεύονται και μένουν ενεργά στο περιβάλλον, από όπου αφομοιώνονται από καλλιεργούμενα είδη-συσσωρευτές και τελικά εισέρχονται σε ποικίλους οργανισμούς διαμέσου της τροφικής αλυσίδας. Με δεδομένο ότι τα φυλλώδη λαχανικά, συμπεριλαμβανομένου του μαρουλιού, θεωρούνται υπερσυσσωρευτές των βαρέων μετάλλων, στόχο της παρούσας έρευνας αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης γονοτύπων μαρουλιού ως προς την ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα, και συγκεκριμένα σε περίσσεια καδμίου και ψευδαργύρου. Παράλληλο στόχο αποτέλεσε ο προσδιορισμός κατάλληλων μεθόδων για τη διάκριση της ανθεκτικότητας και ευαισθησίας και την επιλογή των επιθυμητών γονοτύπων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, ώστε να αναβαθμιστεί η αποτελεσματικότητα των σχετικών διαδικασιών αξιολόγησης γενετικού υλικού. Για την επίτευξη των ανωτέρω στόχων, οι υπό μελέτη γονότυποι αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε περίσσεια καδμίου (0, 50, 100, 200 μM CdCl_2), χλωριούχου ψευδαργύρου (0, 5, 10, 15 mM ZnCl_2) και συνδυασμού τους (100 μM CdCl_2 / 10 mM ZnCl_2) α) στη φάση της βλάστησης/πρώιμης ανάπτυξης και β) σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια και ακολούθησε η εκτίμηση της συσχέτισης της ανθεκτικότητας κατά τα στάδια αυτά ώστε να διαπιστωθεί η αξιοπιστία της πρώιμης επιλογής επιθυμητών γονοτύπων. Η αξιολόγηση αφορούσε σε 14 εμπορικές ποικιλίες μαρουλιού, που ανήκουν στις 4 κύριες βοτανικές ομάδες -ρωμάνα, λείο κεφαλωτό, κατσαρό κεφαλωτό, σαλάτα-, ενώ ως παράμετροι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας αξιοποιήθηκαν α) ποσοστό βλάστησης, μήκος ρίζας και βλαστού και αριθμός σπορόφυτων με μη φυσιολογικό φαινότυπο (φάση της βλάστησης) και β) ανάπτυξη συμπτωμάτων καταπόνησης, ποσοστό περιεχόμενης χλωροφύλλης, ύψος των φυτών, το νωπό και ξηρό βάρος βιομάζας (μεταγενέστερα στάδια).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Φυτικό υλικό

Στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης του μαρουλιού (*Lactuca sativa* L.) υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα, το οποίο είναι ένα από τα πιο σημαντικά φυλλώδη λαχανικά. Με δεδομένο ότι, σύμφωνα με αναφορές, το μαρούλι είναι ευαίσθητο στην καταπόνηση από κάδμιο (Cd) και εμφανίζει αυξημένη συσσώρευση Cd στα βρώσιμα φυτικά μέρη (Matraszek et al., 2015), αποτελεί ένα κατάλληλο μοντέλο για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας έναντι της καταπόνησης Cd σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η απόκριση διαφόρων γονοτύπων μαρουλιού υπό συνθήκες καταπόνησης καδμίου και ψευδαργύρου καθώς και της συνδυασμένης δράσης τους, σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια: α) στη φάση της βλάστησης και πρώιμης ανάπτυξης και β) σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Απώτερο σκοπό αποτέλεσε η συσχέτιση της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας κατά τα πρώιμα και μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια με στόχο την μελέτη της αξιοπιστίας της πρώιμης επιλογής επιθυμητών γονοτύπων.

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε αφορούσε σε 14 εμπορικές ποικιλίες μαρουλιού που ανήκουν στις 4 κύριες βοτανικές ομάδες -ρωμάνα, λείο κεφαλωτό, κατσαρό κεφαλωτό, σαλάτα-, των οποίων η προσαρμοστικότητα σε αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων δεν έχει αποσαφηνιστεί. Οι ποικιλίες που αξιολογήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Εμπορικές ποικιλίες που αξιολογήθηκαν ως προς την απόκρισή τους σε καταπόνηση από υψηλή συγκέντρωση καδμίου, ψευδαργύρου καθώς και της συνδυασμένης δράσης τους.

A/A	Ποικιλία	Τύπος	Χαρακτηριστικά
1	Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana		
2	Lattuga Lollo Rossa		
3	Lattuga Verde Degli ortolani		
4	Iceberg - Great Lakes 659		
5	Black Simson	Μαρούλι σγουρό	

6	Santa Anna	Μαρούλι γαλλικό
7	Red Batavia	
8	Green Batavia	
9	Romana	
10	Lollo Bionda	
11	Geo stor Manchester	
12	Ortis Doris	
13	Romana Green Tower	
14	Romana Hot	

2.2 Απολύμανση σπόρων

Προκειμένου να αποφευχθούν επιμολύνσεις, αρχικά πραγματοποιήθηκε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων μέσω εμβάπτισής τους σε διάλυμα χλωρίνης 10%, για 5 min υπό συνεχή ανάδευση, ακολουθούμενη από 4 πλύσεις με αποστειρωμένο dH₂O. Η διαδικασία της απολύμανσης έλαβε χώρα σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νοηματικής ροής. Όλα τα εργαλεία και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί.

2.3 Μεταχειρίσεις καταπόνησης - Πειραματικό σχέδιο

Όπως προαναφέρθηκε, η αξιολόγηση της απόκρισης γονοτύπων μαρουλιού σε καταπόνηση από βαρέα μέταλλα έγινε α) κατά το στάδιο της βλάστησης και ανάπτυξης των νεαρών σποροφύτων και β) σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Ο έλεγχος της επίδρασης των καταπονήσεων από βαρέα μέταλλα για τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο σε συνθήκες *in vitro* ενώ στα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια η αξιολόγηση αφορούσε σε φυτά που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο.

2.3.1 Στάδιο βλάστησης – *In vitro* συνθήκες

Η απόκριση των 14 διαφορετικών ποικιλιών μαρουλιού μελετήθηκε σε συνθήκες διαφορετικών επιπέδων καταπόνησης καδμίου (Cd), ψευδαργύρου (Zn) καθώς και του συνδυασμού τους (Cd/Zn). Για το σκοπό αυτό, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τριβλία petri (9 mm)

που περιείχαν θρεπτικά υποστρώματα διαφορετικής συγκέντρωσης για τον παράγοντα καταπόνησης:

- CdCl₂: 0 (control), 50, 100, 200 μM
- ZnCl₂: 0 (control), 5, 10, 15 mM και
- CdCl₂ / ZnCl₂: 100 μM / 10 mM αντίστοιχα (υπόστρωμα X₂)

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό των πλήρων τυχαιοποιημένων ομάδων, με 2 επαναλήψεις ανά μεταχείριση και ανά ποικιλία. Η επανάληψη (τριβλίο) αποτελούνταν από 15 σπόρους.

Τα αποτελέσματα από την *in vitro* αξιολόγηση παρείχαν τη δυνατότητα διάκρισης των φαινοτύπων ανθεκτικότητας και ευαισθησίας στο στάδιο αυτό και επιπλέον, επέτρεψαν την κατηγοριοποίηση των ποικιλιών σε ανθεκτικές, μέτριας ανθεκτικότητας και ευαίσθητες στην καταπόνηση από υψηλή συγκέντρωση καδμίου. Βάσει της κατηγοριοποίησης αυτής, επιλέχθηκαν 6 γονότυποι -2 από κάθε κατηγορία- προκειμένου να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητά τους σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια (Πίνακας 2.2). Αναφορικά με την καταπόνηση ψευδαργύρου, τα αποτελέσματα δεν παρείχαν τη δυνατότητα κατηγοριοποίησης των ποικιλιών βάσει της ανθεκτικότητάς τους.

Πίνακας 2.2: Ποικιλίες μαρουλιού που επιλέχθηκαν 6 γονότυποι -2 από κάθε κατηγορία- προκειμένου να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητά τους σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια.

Ποικιλία	Φαινότυπος
Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana	Ανθεκτικότητα
Red Batavia	
Romana	Μέτριας ανθεκτικότητας
Geo stor Manchester	
Romana Green Tower	Ευαισθησία
Romana Hot	

2.3.2 Μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια – Πείραμα θερμοκηπίου

Η απόκριση των 6 επιλεγμένων ποικιλιών μαρουλιού σε καταπόνηση καδμίου (Cd) και του συνδυασμού καδμίου/ψευδαργύρου (Cd/Zn) μελετήθηκε σε φυτά που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο. Η καταπόνηση έγινε μέσω ριζοποτίσματος με διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης του παράγοντα καταπόνησης:

→ CdCl₂: 0 (control), 50, 100, 200 μM

→ CdCl₂ / ZnCl₂: 100 μM / 10 mM αντίστοιχα (διάλυμα X₂)

Το πειραματικό σχέδιο ήταν αυτό των υποδιαιρεμένων τεμαχίων-split plot με 4 επαναλήψεις ανά μεταχείριση και ανά ποικιλία. Στο πείραμα, συμπεριλήφθηκαν συνολικά 120 γλάστρες.

2.4 Καταπόνηση με βαρέα μέταλλα

2.4.1 Στάδιο βλάστησης – In vitro συνθήκες

Το κάδμιο χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα με τη μορφή του χλωριούχου καδμίου (CdCl₂) και ο ψευδάργυρος με τη μορφή του χλωριούχου ψευδαργύρου (ZnCl₂). Η σύσταση των υποστρωμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας σε συνθήκες *in vitro*.

Καταπόνηση Καδμίου (CdCl ₂)			
Control	50 μM	100 μM	200 μM
MS :1.1g/500 ml	MS :1.1g/500 ml	MS :1.1g/500 ml	MS :1.1g/500 ml
Sucrose:5g/500ml	Sucrose:5g/500ml	Sucrose:5g/500ml	Sucrose:5g/500ml
Agar: 2.5g/500 ml	Agar: 2.5g	Agar: 2.5g/500 ml	Agar: 2.5g
	CdCl ₂ : 0.00533g/500 ml	CdCl ₂ : 0.01066g/500 ml	CdCl ₂ : 0.02132g/500 ml

Καταπόνηση Ψευδαργύρου (ZnCl ₂)			
Control	5 mM	10 mM	15 mM

MS :1.1g/500 ml	MS :1.1g/500 ml	MS :1.1g/500 ml	MS :1.1g/500 ml
Sucrose:5g/500ml	Sucrose:5g/500ml	Sucrose:5g/500ml	Sucrose:5g/500ml
Agar: 2.5g/500 ml	Agar: 2.5g	Agar: 2.5g/500 ml	Agar: 2.5g
	ZnCl ₂ : 0.130g /500 ml	ZnCl ₂ : 0.260g /500 ml	ZnCl ₂ : 0.490g /500 ml

Καταπόνηση συνδυασμένης δράσης Καδμίου – Ψευδαργύρου (CdCl ₂ + ZnCl ₂)				
100 μM CdCl ₂ / 10mM ZnCl ₂ : (X ₂)				
MS :1.1g/500 ml	Sucrose:5g/500ml	Agar: 2.5g/500 ml	CdCl ₂ :	ZnCl ₂ :
			0.01066g	0.260g /500
			/500 ml	ml

Για την παρασκευή των υποστρωμάτων, τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη, το MS, η σουκρόζη, και η κατά περίπτωση ποσότητα βαρέος μετάλλου και ακολούθησε προσθήκη dH₂O σε τελικό όγκο 500 ml και ρύθμιση του pH σε τιμή 5.6 - 5.8. Ακολούθησε προσθήκη άγαρ και αποστείρωση των διαλυμάτων σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 121 °C για 1 h. Έγινε τοποθέτηση των θρεπτικών υποστρωμάτων στα τριβλία (~ 20 ml / τριβλίο) σε τράπεζα νηματικής ροής για αποφυγή επιμολύνσεων. Ακολούθησε η τοποθέτηση των απολυμασμένων σπόρων (15 σπόροι/τριβλίο) και επώαση των τριβλίων σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (25°C, φωτοπερίοδος: 16 h φως/8 h σκοτάδι) για διάστημα περίπου 20 ημερών.

2.4.2 Μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια – Πείραμα θερμοκηπίου

Για την μελέτη της απόκρισης των ποικιλιών μαρουλιού σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, αρχικά έγινε σπορά των ποικιλιών σε δίσκους σποράς που περιείχαν τύρφη και περλίτη σε αναλογία 3 : 1 (2- 3 σπόροι ανά σποροδοχείο). Κατά το φύτευμα των σπόρων, πραγματοποιούνταν αραίωμα ώστε να εξασφαλίζεται η απρόσκοπτη ανάπτυξη των σπορόφυτων. Κατά το στάδιο των 3 έως 5 πραγματικών φύλλων, πραγματοποιήθηκε μεταφύτευση των σπορόφυτων σε φυτοδοχεία (1 lt) (19/06/2018) και μεταφορά των τελευταίων στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών.

Η χορήγηση των βαρέων μετάλλων έγινε με ριζοπότισμα, στο στάδιο των 5-8 πραγματικών φύλλων, χρησιμοποιώντας διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων με dH₂O:

→ Control: dH₂O

- 50 μM CdCl_2 : 0.01066 g / L
- 100 μM CdCl_2 : 0.02132 g / L
- 200 μM CdCl_2 : 0.04264 g / L
- 100 μM CdCl_2 / 10 mM ZnCl_2 : (0.02132 g + 0.52 g) / L(διάλυμα X₂)

Το πρώτο πότισμα με διαλύματα βαρέων μετάλλων έγινε περίπου 10 ημέρες μετά τη μεταφύτευση (30/06/2018), ώστε τα φυτά να ανακάμψουν από το στρες της μεταφύτευσης. Αρχικά, χορηγούνταν 100 ml διαλύματος/φυτοδοχείο ανά 3 ημέρες, ενώ ενδιάμεσα πραγματοποιούνταν πότισμα με νερό βρύσης (έως 06/07/2018). Έπειτα, τα ποτίσματα εφαρμόζονταν ανά δύο ημέρες, με ενδιάμεσα ποτίσματα με νερό βρύσης (έως 13/07/2018), ενώ στη συνέχεια το πότισμα γινόταν καθημερινά, μέχρι τις 15/07/2018 όπου ξεκίνησε πότισμα με χορήγηση 200 ml/φυτοδοχείο (έως 23/07/2018).

2.5 Παράμετροι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των υπό μελέτη ποικιλιών μαρουλιού υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα, πραγματοποιήθηκε α) στη φάση της βλάστησης και ανάπτυξης των νεαρών σποροφύτων, σε συνθήκες *in vitro* και β) σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, σε συνθήκες θερμοκηπίου.

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας στη φάση της βλάστησης βασίστηκε στην εκτίμηση των ακόλουθων φυσιολογικών παραμέτρων:

- ποσοστό (%) βλάστησης
- μήκος ρίζας και βλαστού
- αριθμός σποροφύτων με μη φυσιολογικό φαινότυπο

Ως παράμετροι αξιολόγησης της ανθεκτικότητας στα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια αξιοποιήθηκαν τα ακόλουθα γνωρίσματα:

- ποσοστό περιεχόμενης χλωροφύλλης
- ύψος φυτών
- νωπό και ξηρό βάρος

2.5.1 Μετρήσεις στο στάδιο βλάστησης

Για την εκτίμηση του ποσοστού βλάστησης των σπόρων, λαμβάνονταν μετρήσεις ανά 2-3 ημέρες. Ως βλαστήσαντες λαμβάνονταν οι σπόροι όπου το ελάχιστο μήκος ριζιδίου ήταν 2mm, που θεωρείται ως το στάδιο κατά το οποίο ολοκληρώνεται η φάση της βλάστησης. Η έναρξη της βλάστησης τοποθετείται στις 23/03/2018.

Το ποσοστό βλάστησης εκτιμήθηκε σύμφωνα με το τύπο:

$$GP = (\text{αριθμός σπόρων που βλάστησαν} / \text{συνολικός αριθμός σπόρων}) \times 100.$$

Αναφορικά με το μήκος ρίζας και βλαστού, η πρώτη ημερομηνία παρατήρησης ήταν στις 01/04/2018 και 04/04/2018 αντίστοιχα. Ακολούθησε εκ νέου μέτρηση του μήκους των ιστών ανά 3 μέρες πραγματοποιούταν καινούρια μέτρηση και λήψη φωτογραφιών. Σε κάθε μέτρηση, λαμβάνονταν παρατηρήσεις αναφορικά με την ύπαρξη σπορόφυτων με μη φυσιολογικό φαινότυπο.

2.5.2 Μετρήσεις σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια

Ύψος φυτών

Για τη μέτρηση του ύψους των φυτών, υπολογίστηκε η απόσταση από το λαιμό έως το ανώτερο σημείο του άξονα του βλαστού. Οι παρατηρήσεις λήφθηκαν στις 04/07/2018, 08/07/2018 και 16/07/2018 αντίστοιχα.

Χλωροφύλλη

Το ποσοστό περιεχόμενης χλωροφύλλης μετρήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους: α) μέσω του χλωροφυλλόμετρου SPAD (Minolta Chlorophyll Meter SPAD-502) και β) με μέτρηση φθορισμού της χλωροφύλλης.

Για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης με χρήση SPAD, πραγματοποιήθηκε μέτρηση 4 φύλλων, από το μεσαίο τμήμα των φυτών, και στη συνέχεια υπολογίζονταν ο μέσος όρος τους. Η μέτρηση με χρήση SPAD έγινε σε 2 ημερομηνίες (10/07/2018 και 23/07/2018).

Για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης με τη μέτρηση φθορισμού της χλωροφύλλης, προσδιορίστηκε η απορρόφηση σε 665 nm και 649 nm. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε λήψη 6 φυλλικών δίσκων από τα ελάσματα των φύλλων, με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα διαμέτρου 5,3 mm. Οι φυλλικοί δίσκοι τοποθετήθηκαν σε τριβλία petri (9 mm) που περιείχαν διαλύματα ίδιας μεταχείρισης με αυτή που αντιστοιχούσε στην προέλευση του φύλλου (Control, 50μM Cd, 100μM Cd, 200μM Cd και 100μM Cd / 10mM Zn). Η επώαση των φυλλικών δίσκων διήρκεσε 24 ώρες, και ακολούθησε η εκτίμηση του νωπού τους βάρους σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Ακολούθησε εκχύλιση του φυτικού ιστού με τοποθέτηση των φυλλικών δίσκων (6) σε falcon που περιείχαν 15 ml αιθανόλης, επώαση σε υδατόλουτρο, στους 80 °C, έως τον αποχρωματισμό των φυλλικών δίσκων και φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός χλωροφύλλης σε φασματοφωτόμετρο UV-1800 (Εικόνα 2.1) σε δύο διαφορετικές απορροφήσεις:

→ Απορρόφηση (ABS) 665 nm

→ Απορρόφηση (ABS) 649 nm

Για τον υπολογισμό της χλωροφύλλης α και χλωροφύλλης β για κάθε δείγμα, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι τύποι:

→ $Cl a \mu g/ml \text{ αιθανόλης} = (13.7 * ABS \text{ } 665nm) - (5.76 * ABS \text{ } 649 \text{ nm})$

→ $Chl b \mu g/ml \text{ αιθανόλης} = (25.8 * ABS \text{ } 649 \text{ nm}) - (7.6 * ABS \text{ } 665 \text{ nm})$



Εικόνα 2.1: Φασματοφωτόμετρο UV-1800 όπου προσδιορίστηκε το ποσοστό περιεχόμενης χλωροφύλλης των καταπονημένων από βαρέα μέταλλα φυτών και των φυτών μαρτύρων.

Χλωρό Βάρος

Προκειμένου να εκτιμηθεί το χλωρό βάρος της βιομάζας των καταπονημένων και των φυτών μαρτύρων, πραγματοποιήθηκε κοπή των φυτών (24/07/2018) και ζύγιση των δειγμάτων σε ζυγό ακριβείας. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως διαφορά του νωπού βάρους των δειγμάτων που δέχτηκαν την καταπόνηση βαρέων μετάλλων σε σύγκριση με τα δείγματα του μάρτυρα.

Ξηρό Βάρος

Έπειτα από τη ζύγιση του χλωρού βάρους, ακολούθησε τοποθέτηση των δειγμάτων σε ξηραντήρα, σε θερμοκρασία περίπου 60 °C, και επώαση για διάστημα 15 ημερών. Πραγματοποιήθηκε ζύγιση των δειγμάτων σε ζυγό ακριβείας. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως διαφορά του ξηρού βάρους των δειγμάτων που δέχτηκαν την καταπόνηση βαρέων μετάλλων σε σύγκριση με τα δείγματα του μάρτυρα.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, που προέκυψαν από τα πειράματα σε *in vitro* συνθήκες και τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκήπιο, έγινε μέσω του στατιστικού πακέτου SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, version 20.0. Armonk, NY, IBM Corp). Τα δεδομένα αναλύθηκαν ξεχωριστά για κάθε επέμβαση (διαφορετική συγκέντρωση παράγοντα καταπόνησης, γονότυπο και ημερομηνία παρατήρησης, two way-ANOVA). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση παραλλακτικότητας για την αλληλεπίδραση των ανωτέρω παραγόντων. Οι διαφορές μεταξύ των μέσων όρων συγκρίθηκαν με τη χρήση της ελάχιστης διαφοράς LSD test ($p < 0.005$) καθώς και με την εκτίμηση της σημαντικότητας (sig). Το σύνολο των διαγραμμάτων και γραφημάτων κατασκευάστηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS.

Αποτελέσματα

Οι υπό μελέτη γονότυποι αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε περίσσεια βαρέων μετάλλων, και συγκεκριμένα καδμίου και ψευδαργύρου, α) στη φάση της βλάστησης και β) σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια και ακολούθησε η εκτίμηση της συσχέτισης της ανθεκτικότητας κατά τα στάδια αυτά ώστε να διαπιστωθεί η δυνατότητα διάκρισης της ανθεκτικότητας και ευαισθησίας σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και η μετέπειτα επιλογή των επιθυμητών γονοτύπων κατά τα στάδια αυτά.

3.1 Καταπόνηση από βαρέα μέταλλα στη φάση της βλάστησης

Αρχικά, έγινε *in vitro* αξιολόγηση του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης 14 εμπορικών ποικιλιών μαρουλιού, που ανήκουν στις 4 κύριες βοτανικές ομάδες -ρωμάνα, λείο κεφαλωτό, κατσαρό κεφαλωτό, σαλάτα-, σε διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης Cd (0, 50, 100, 200 μM) και Cd / Zn (100 μM / 10 mM). Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας βασίστηκε σε γνωρίσματα όπως το ποσοστό βλάστησης, το μήκος ρίζας και βλαστού και ο αριθμός σπορόφυτων με μη φυσιολογικό φαινότυπο.

Κατά τη φάση της βλάστησης, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι η καταπόνηση δεν επηρέασε σημαντικά το δυναμικό βλάστησης των σπόρων, ενώ αντίθετα υπογραμμίζουν την αρνητική επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στα γνωρίσματα που σχετίζονται με την ανάπτυξη των σποροφύτων μαρουλιού. Στο σύνολο των ποικιλιών, η επίδραση της προκαλούμενης από βαρέα μέταλλα τοξικότητας ήταν ανάλογη με το επίπεδο του εφαρμοζόμενου στρες και, όπως αναμενόταν, παρουσίασε μεγιστοποίηση στο υψηλότερο επίπεδο καταπόνησης (200 μM Cd). Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο, ότι η συνδυασμένη εφαρμογή καδμίου-ψευδαργύρου, αν και οδήγησε σε μειωμένο ποσοστό βλάστησης, επέδρασε θετικά στην ανάπτυξη των σποροφύτων, πιθανώς λόγω της θετικής επίδρασης του ψευδαργύρου έναντι της τοξικότητας από κάδμιο.

3.1.1 Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων

Αναφορικά με το ποσοστό βλάστησης, τα αποτελέσματα από την *in vitro* αξιολόγηση κατέδειξαν ότι επηρεάστηκε σημαντικά από την καταπόνηση, από τον παράγοντα ποικιλία καθώς και από την αλληλεπίδραση επέμβασης-ποικιλίας (Πίνακας 3.1). Η έναρξη της βλάστησης των σπόρων έλαβε χώρα την 3^η μέρα, ωστόσο σημειώθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις σε επίπεδο γονοτύπου. Ειδικότερα, στα φυτά μάρτυρες, σημαντικά αυξημένο ποσοστό βλάστησης παρουσίασαν οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana, Μαρούλι σγουρό - Black Simson, Green Batavia, Romana, Geo store Manchester, Ortis Doris, Romana Green Tower και η Romana Hot με ποσοστό από 92 έως 100 % (Γράφημα 3.1). Ακολούθησαν οι ποικιλίες Lattuga Lollo Rossa, Red Batavia, με ποσοστό περίπου 85 %, ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισαν οι ποικιλίες Latugga Verde degli ortolani, Μαρούλι Iceberg - Great Lakes 659 και Lollo Bionda, με την πρώτη να παρουσιάζει την μικρότερη τιμή καθόλη τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης (20 % κατά την τελευταία ημερομηνία παρατήρησης).

Πίνακας 3.3: Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων σε 14 εμπορικές ποικιλίες.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Germination

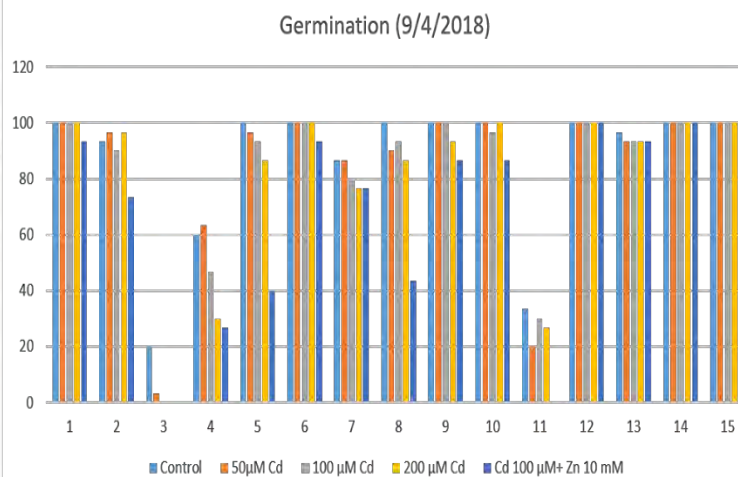
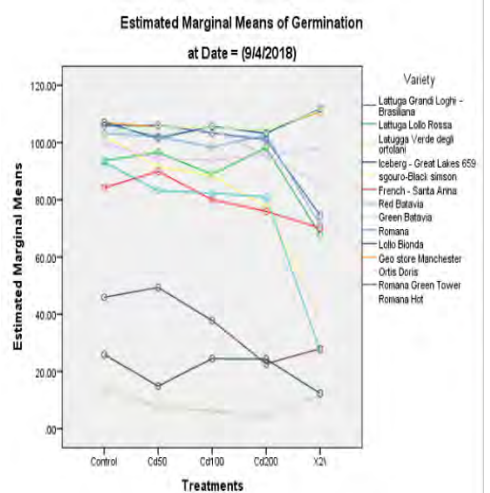
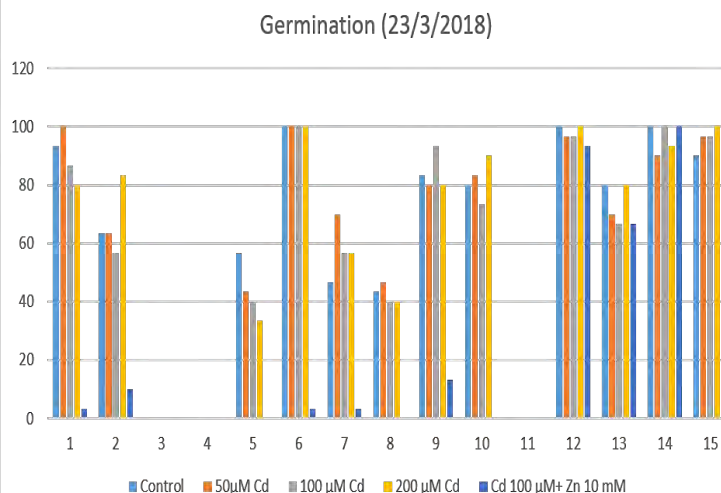
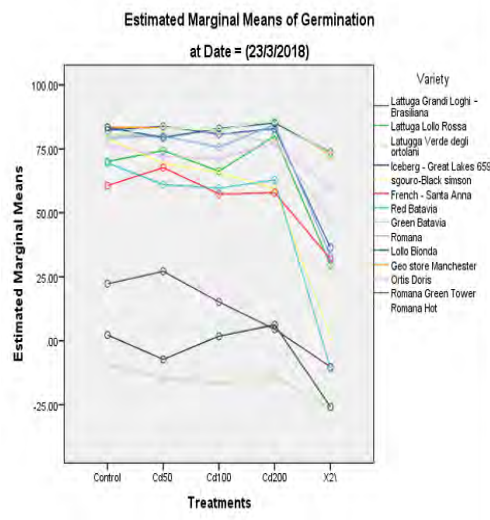
Source		Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	4268729.243	1	4268729.243	322.725	.000
	Error	67139.769	5.076	13227.132 ^a		
Treatments	Hypothesis	64862.809	4	16215.702	84.645	.000
	Error	1835.267	9.580	191.573 ^b		
Variety	Hypothesis	827648.685	13	63665.283	581.775	.000
	Error	80980.233	740	109.433 ^c		
Rep	Hypothesis	217.750	1	217.750	5.629	.077
	Error	154.743	4	38.686 ^d		
Date	Hypothesis	65594.073	5	13118.815	50.011	.000
	Error	5246.399	20	262.320 ^e		
Treatments * Variety	Hypothesis	64809.465	52	1246.336	11.389	.000
	Error	80980.233	740	109.433 ^c		

Treatments * Rep	Hypothesis	154.743	4	38.686	.354	.842
	Error	80980.233	740	109.433 ^c		
Treatments * Date	Hypothesis	5246.399	20	262.320	2.397	.001
	Error	80980.233	740	109.433 ^c		

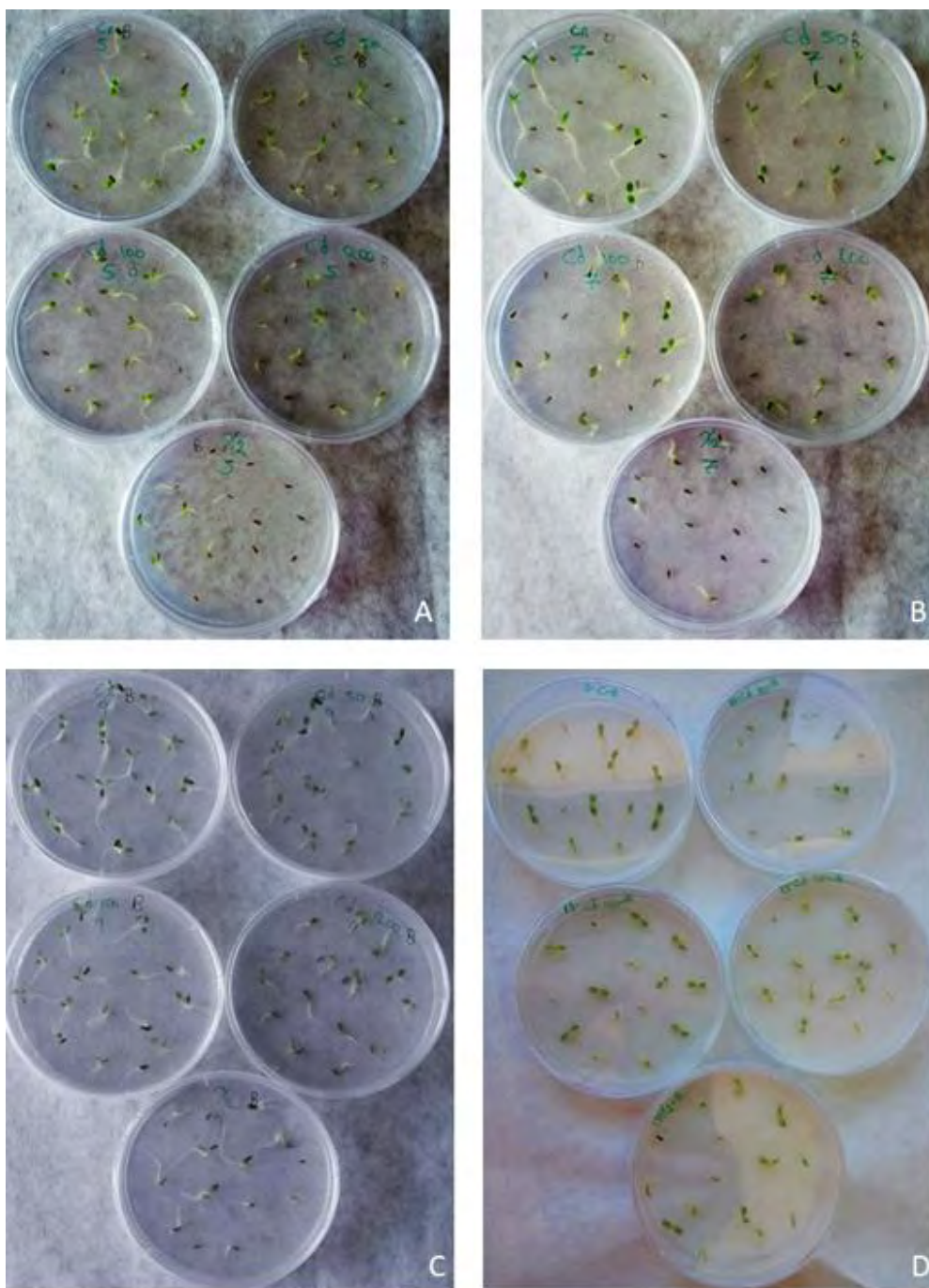
- $MS(Rep) + MS(Date) - MS(Error)$
- $MS(Treatments * Rep) + MS(Treatments * Date) - MS(Error)$
- $MS(Error)$
- $MS(Treatments * Rep)$
- $MS(Treatments * Date)$

Στο πλείστο των περιπτώσεων, το εφαρμοζόμενο επίπεδο καταπόνησης φάνηκε να μην διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο γνώρισμα του ποσοστού βλάστησης των σπόρων. Συγκεκριμένα, το ποσοστό βλάστησης δε μειώθηκε σημαντικά από την καταπόνηση Cd, ακόμη και στο υψηλό επίπεδο στρες (200 μM), συγκριτικά με τους μάρτυρες για το σύνολο σχεδόν των υπό μελέτη ποικιλιών. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της βλαστικότητας στη συνδυασμένη καταπόνηση καδμίου και ψευδαργύρου (Εικόνα 3.1).

Ειδικότερα, τα αποτελέσματα από τη στατιστική ανάλυση υποδεικνύουν ότι, ως προς τις επεμβάσεις, ο μάρτυρας και το χαμηλό επίπεδο στρες Cd (50 μM) δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά. Ανάλογα, απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς σημειώθηκε μεταξύ του χαμηλού και μεσαίου επιπέδου στρες (100 μM) καθώς και μεταξύ του μεσαίου και υψηλού επιπέδου στρες (200 μM) (Πίνακας 3.2). Αντίθετα, η επέμβαση της συνδυασμένης καταπόνησης Cd-Zn διέφερε σημαντικά από όλες τις επεμβάσεις, εμφανίζοντας το χαμηλότερο ποσοστό βλάστησης στο σύνολο των ποικιλιών αλλά και καθόλη τη διάρκεια της περιόδου λήψης παρατηρήσεων (Γράφημα 3.2). Σε αυτή την μεταχείριση, οι ποικιλίες Geo store Manchester, Romana Green Tower και Romana Hot εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης (98 – 100 %), ενώ τις μικρότερες τιμές εμφάνισαν οι ποικιλίες Latugga Verde degli ortolani, Μαρούλι Iceberg - Great Lakes 659, Μαρούλι σγουρό - Black Simson, Μαρούλι Γαλλικό - Santa Anna και Lollo Bionda (Γράφημα 3.1).



Γράφημα 3.1: Ποσοστό βλάστησης σπόρων μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)) από την 3^η έως την 20^η μέρα από την έναρξη της καταπόνησης.



Εικόνα 3.1: Βλάστηση και ανάπτυξη διαφορετικών γονοτύπων μαρουλιού υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)). (A) Green Batavia, (B) Μαρούλι Γαλλικό - Santa Anna, (C) Μαρούλι σγουρό - Black Simson και (D) Ortis Doris κατά την 12^η ημέρα της καταπόνησης (1/04/2018).

Πίνακας 3.4: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ποσοστού βλάστησης μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)).

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Germination

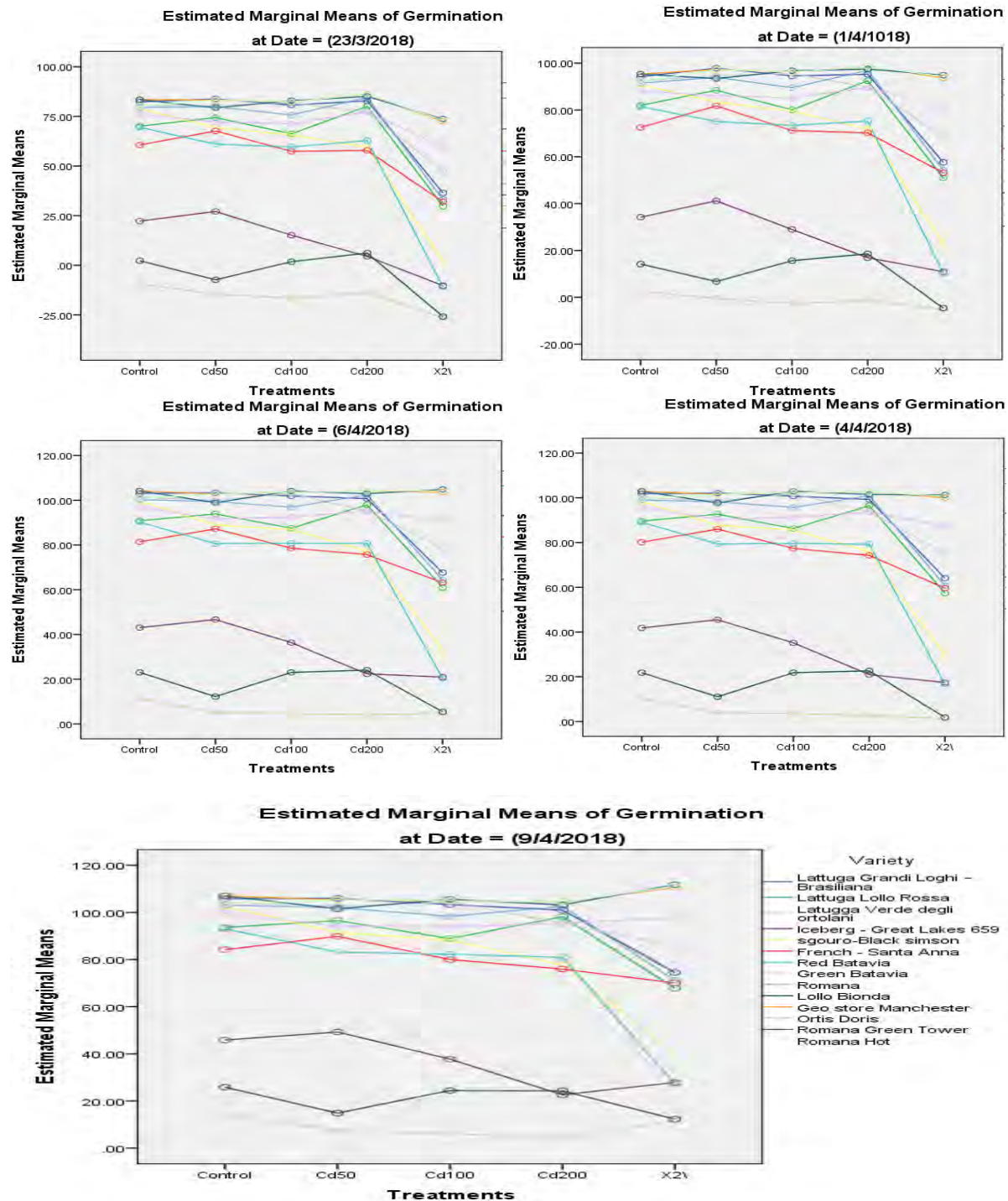
LSD

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Cd50	1.8313*	.68369	.008	.4873	3.1752
	Cd100	3.3392*	.68369	.000	1.9953	4.6831
	Cd200	4.4503*	.68369	.000	3.1064	5.7942
	X2\	24.0535*	.68369	.000	22.7096	25.3974
Cd50	Control	-1.8313*	.68369	.008	-3.1752	-.4873
	Cd100	1.5079*	.68369	.028	.1640	2.8519
	Cd200	2.6190*	.68369	.000	1.2751	3.9630
	X2\	22.2222*	.68369	.000	20.8783	23.5662
Cd100	Control	-3.3392*	.68369	.000	-4.6831	-1.9953
	Cd50	-1.5079*	.68369	.028	-2.8519	-.1640
	Cd200	1.1111	.68369	.105	-.2328	2.4550
	X2\	20.7143*	.68369	.000	19.3704	22.0582
Cd200	Control	-4.4503*	.68369	.000	-5.7942	-3.1064
	Cd50	-2.6190*	.68369	.000	-3.9630	-1.2751
	Cd100	-1.1111	.68369	.105	-2.4550	.2328
	X2\	19.6032*	.68369	.000	18.2592	20.9471
X2\	Control	-24.0535*	.68369	.000	-25.3974	-22.7096
	Cd50	-22.2222*	.68369	.000	-23.5662	-20.8783
	Cd100	-20.7143*	.68369	.000	-22.0582	-19.3704
	Cd200	-19.6032*	.68369	.000	-20.9471	-18.2592

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 39.264.

*. The mean difference is significant at the .05 level.



Γράφημα 3.2: Ποσοστό βλάστησης σπόρων μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) κατά τις 5 ημερομηνίες λήψης παρατηρήσεων.

3.1.2 Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στα αναπτυξιακά γνωρίσματα των σπορόφυτων

Η επόμενη μεταβλητή που αξιολογήθηκε ήταν η ανάπτυξη των νεαρών σπορόφυτων και συγκεκριμένα, το μήκος της ρίζας και του βλαστού. Όπως ήταν αναμενόμενο, το μήκος ρίζας και βλαστού επηρεάστηκαν σημαντικά από την επέμβαση, την ποικιλία, το χρόνο έκθεσης στην καταπόνηση αλλά και την αλληλεπίδρασή τους (Πίνακες 3.3 και 3.4).

Καθόλη τη διάρκεια λήψης παρατηρήσεων, το μήκος της ρίζας και βλαστού παρουσίασε μια τάση μείωσης που ήταν ανάλογη με το εφαρμοζόμενο επίπεδο στρες καδμίου. Ωστόσο, η συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn επέδρασε θετικά στην ανάπτυξη των σπορόφυτων, καθώς σημειώθηκε αυξημένο μήκος ρίζας και βλαστού συγκριτικά με το μεσαίο (Cd 100μM) και υψηλό (Cd 200mM) επίπεδο στρες. Η παρατηρηθείσα βελτιωμένη επίδοση παρέχει ενδείξεις σχετικά με τη θετική επίδραση του Zn σε συνδυασμό με το Cd ως προς την απόκριση των φυτών σε στρες του Cd.

Αναφορικά με το χρόνο έκθεσης στην καταπόνηση, το μήκος ρίζας και βλαστού παρουσίασε τάση αύξησης με την πάροδο του χρόνου, με εξαίρεση το υψηλό επίπεδο καταπόνησης όπου παρέμεινε αμετάβλητο στο χρόνο, υποδεικνύοντας ότι η αναστολή της ανάπτυξης παρουσιάζει σημαντική ποσοτική συσχέτιση με το επίπεδο του εφαρμοζόμενου στρες.

Πίνακας 3.5: Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο μήκος ρίζας σπορόφυτων μαρουλιού σε 14 εμπορικές ποικιλίες μαρουλιού

Tests of Between-Subjects Effects						
Dependent Variable: Root						
Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	3659.155	1	3659.155	143831.461	.002
	Error	.025	1	.025 ^a		
Treatments	Hypothesis	782.864	4	195.716	5097.972	.000
	Error	.154	4	.038 ^b		
Variety	Hypothesis	958.250	13	73.712	401.048	.000
	Error	111.197	605	.184 ^c		
Date	Hypothesis	274.327	4	68.582	373.138	.000

Rep	Error	111.197	605	.184 ^c		
	Hypothesis	.025	1	.025	.663	.461
Treatments * Rep	Error	.154	4	.038 ^b		
	Hypothesis	.154	4	.038	.209	.934
Treatments * Variety	Error	111.197	605	.184 ^c		
	Hypothesis	478.614	52	9.204	50.078	.000
Treatments * Date	Error	111.197	605	.184 ^c		
	Hypothesis	92.834	16	5.802	31.568	.000
	Error	111.197	605	.184 ^c		

a. MS(Rep)

b. MS(Treatments * Rep)

c. MS(Error)

Πίνακας 3.4: Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου στο μήκος βλαστού σπορόφυτων μαρουλιού σε 14 εμπορικές ποικιλίες μαρουλιού

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Stem

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	1689.024	1	1689.024	10591.568	.006
	Error	.159	1	.159 ^a		
Variety	Hypothesis	433.014	13	33.309	406.139	.000
	Error	38.546	470	.082 ^b		
Treatments	Hypothesis	270.455	4	67.614	2020.472	.000
	Error	.134	4	.033 ^c		
Date	Hypothesis	68.190	3	22.730	277.149	.000
	Error	38.546	470	.082 ^b		
Rep	Hypothesis	.159	1	.159	4.765	.094
	Error	.134	4	.033 ^c		
Variety * Treatments	Hypothesis	138.929	52	2.672	32.577	.000
	Error	38.546	470	.082 ^b		
Treatments * Date	Hypothesis	27.562	12	2.297	28.005	.000
	Error	38.546	470	.082 ^b		
Treatments * Rep	Hypothesis	.134	4	.033	.408	.803
	Error	38.546	470	.082 ^b		

a. MS(Rep)

- b. MS(Error)
- c. MS(Treatments * Rep)

→ Μήκος ρίζας

Συγκεκριμένα, αναφορικά με το μήκος ρίζας, τα ευρήματα υποδηλώνουν την αρνητική επίδραση της καταπόνησης από κάδμιο στη φάση της βλάστησης για το σύνολο των υπό μελέτη γονοτύπων. Ειδικότερα, στα φυτά μάρτυρες το μήκος της ρίζας κυμάνθηκε από 5,5 έως 7 cm κατά την τελευταία ημερομηνία παρατήρησης (12/04/2018). Στο στάδιο αυτό, οι ποικιλίες Iceberg Great Lakes 659 και Lollo Bionda παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές. Αντίστοιχα, στο χαμηλό επίπεδο στρες (Cd 50μM), το εύρος τιμών κυμάνθηκε μεταξύ 3,5 και 5,5 cm, καταδεικνύοντας την άμεση επίδραση της τοξικότητας του καδμίου στο γνώρισμα του μήκους ρίζας.

Στο μεσαίο επίπεδο καταπόνησης (Cd 100μM), κατά το στάδιο αυτό (12/04/2018), το μήκος ρίζας ήταν μεταξύ 2 έως 4 cm για τις περισσότερες ποικιλίες, με εξαίρεση τις Geo Store Manchester, Ortis Doris, Romana green Tower και Romana Hot που εμφάνισαν τις μικρότερες τιμές συγκριτικά με τους υπόλοιπους γονότυπους. Είναι αξιοσημείωτο, ότι στη υψηλό επίπεδο στρες (Cd 200 μM), σημειώθηκε αναστολή ανάπτυξης από την 17^η ημέρα καταπόνησης (4/04/2018). Παράλληλα, στο επίπεδο σημειώθηκε αποχρωματισμός και καφέτιασμα της ρίζας στο σύνολο των υπό μελέτη ποικιλιών. Το μικρότερο μήκος ρίζας σε αυτό το επίπεδο, παρουσίασαν οι ποικιλίες Μαρούλι Iceberg - Great Lakes 659, Μαρούλι σγουρό - Black Simson, Μαρούλι Γαλλικό - Santa Anna, Romana Green Tower, Romana Hot, με μήκος ρίζας έως 0.5cm (Γράφημα 3.4). Αντίθετα, το μεγαλύτερο μήκος ρίζας εμφάνισαν οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana, Red Batavia, Lattuga Lollo Rossa, Romana, Geo store Manchester, με την Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana και την Red Batavia, με τις δύο πρώτες να εμφανίζουν μία υπεροχή (>1 cm) καταδεικνύοντας έτσι ένα είδος ανθεκτικότητας.

Κατά την επέμβαση της συνδυασμένης καταπόνησης Cd-Zn (X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)), το μήκος ρίζας κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα με το χαμηλό επίπεδο στρες Cd (50μM), χωρίς να καταγραφούν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις εν λόγω μεταχειρίσεις (Πίνακας 3.5). Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν πρόσθετες ενδείξεις τόσο για την αρνητική επίδραση του καδμίου στην αύξηση και ανάπτυξη όσο και για το θετικό ρόλο του ψευδάργυρου έναντι της τοξικότητας του καδμίου (Γράφημα 3.3).

Πίνακας 3.5: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του μήκους ρίζας μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)).

Multiple Comparisons

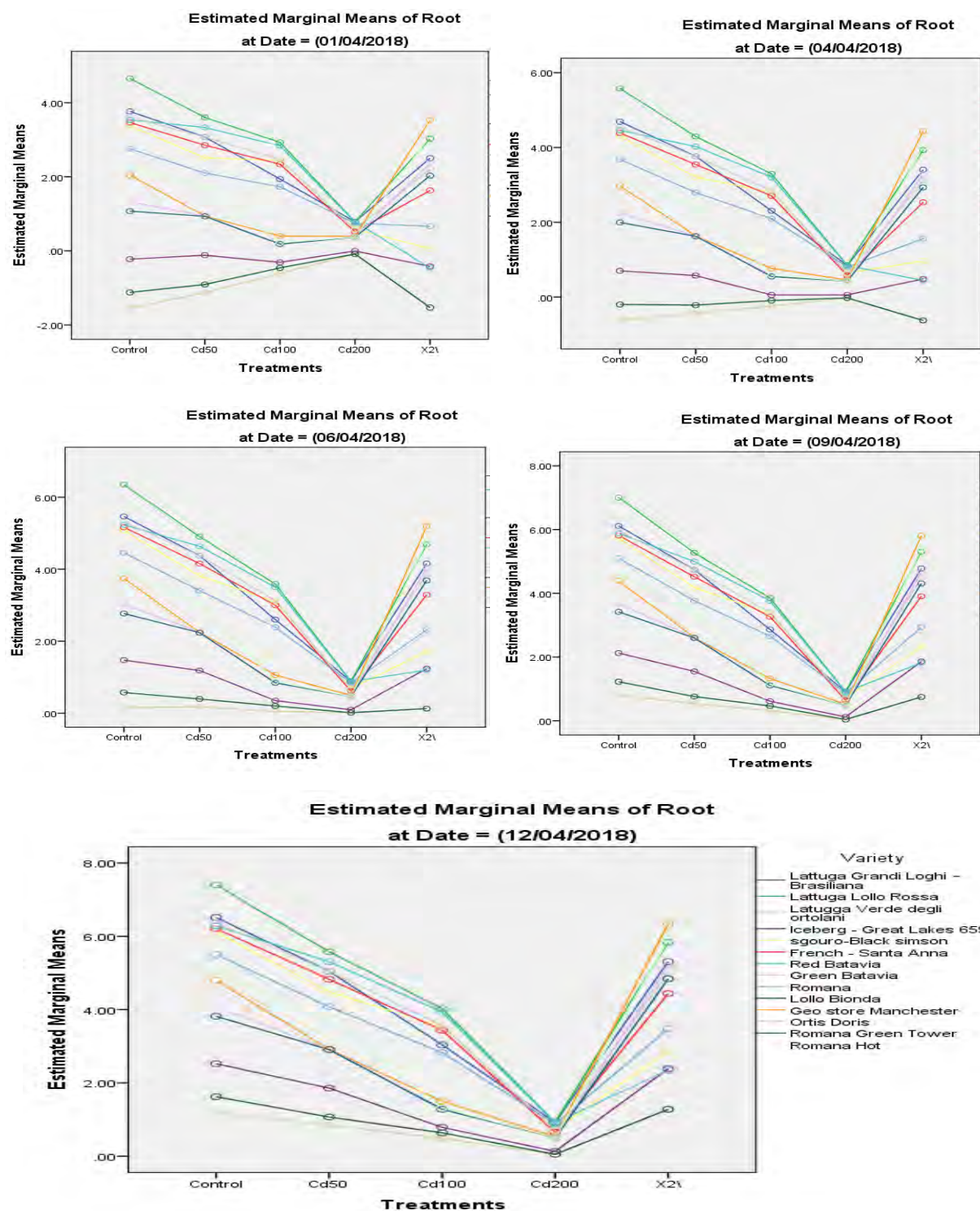
Dependent Variable: Root

LSD

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Cd50	.8446*	.05124	.000	.7440	.9453
	Cd100	1.8366*	.05124	.000	1.7359	1.9372
	Cd200	3.0919*	.05124	.000	2.9913	3.1926
	X2\	.8541*	.05124	.000	.7534	.9547
Cd50	Control	-.8446*	.05124	.000	-.9453	-.7440
	Cd100	.9919*	.05124	.000	.8913	1.0926
	Cd200	2.2473*	.05124	.000	2.1467	2.3479
	X2\	.0094	.05124	.854	-.0912	.1101
Cd100	Control	-1.8366*	.05124	.000	-1.9372	-1.7359
	Cd50	-.9919*	.05124	.000	-1.0926	-.8913
	Cd200	1.2554*	.05124	.000	1.1547	1.3560
	X2\	-.9825*	.05124	.000	-1.0831	-.8819
Cd200	Control	-3.0919*	.05124	.000	-3.1926	-2.9913
	Cd50	-2.2473*	.05124	.000	-2.3479	-2.1467
	Cd100	-1.2554*	.05124	.000	-1.3560	-1.1547
	X2\	-2.2379*	.05124	.000	-2.3385	-2.1372
X2\	Control	-.8541*	.05124	.000	-.9547	-.7534
	Cd50	-.0094	.05124	.854	-.1101	.0912
	Cd100	.9825*	.05124	.000	.8819	1.0831
	Cd200	2.2379*	.05124	.000	2.1372	2.3385

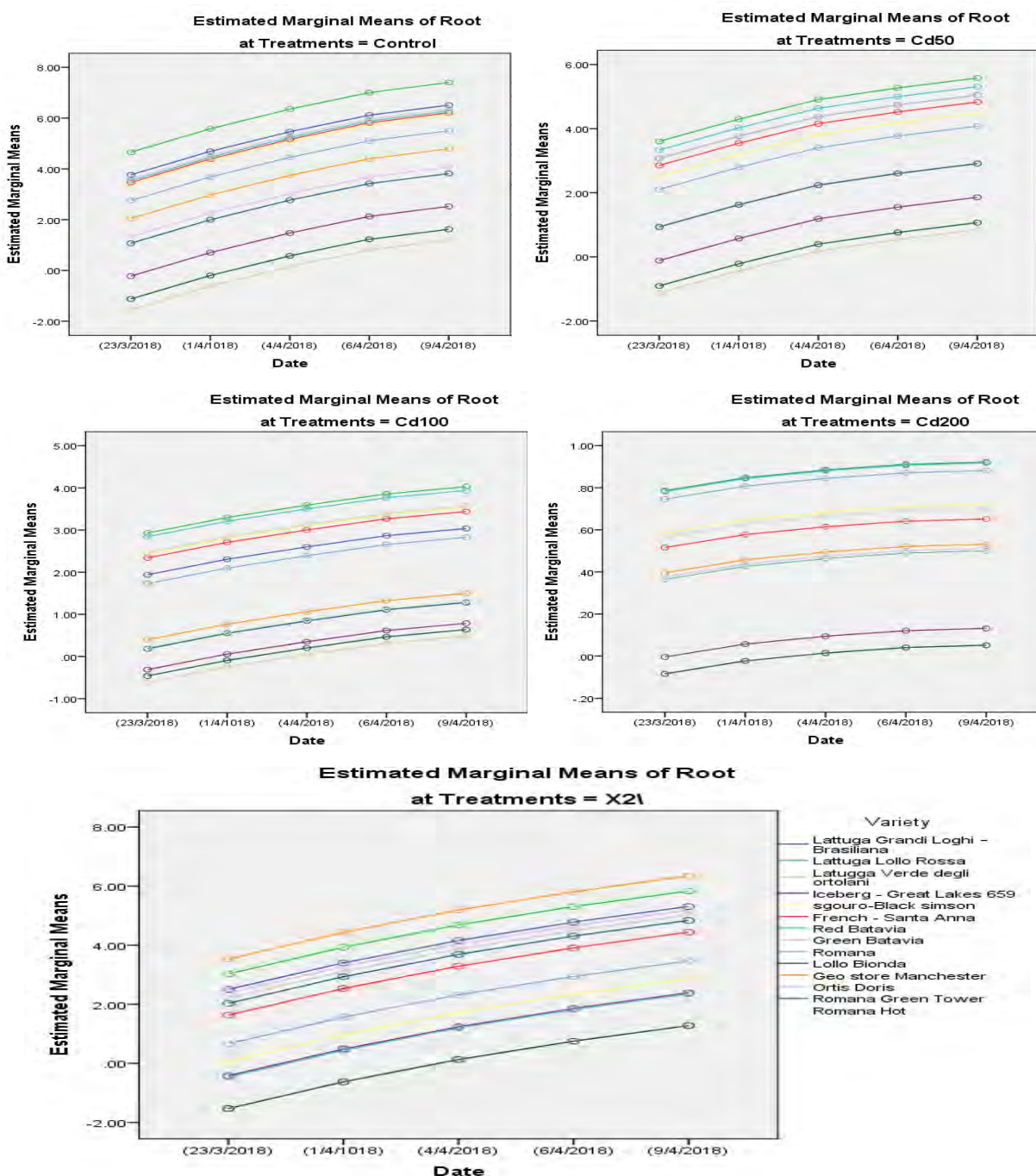
Based on observed means. The error term is Mean Square(Error) = .184.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

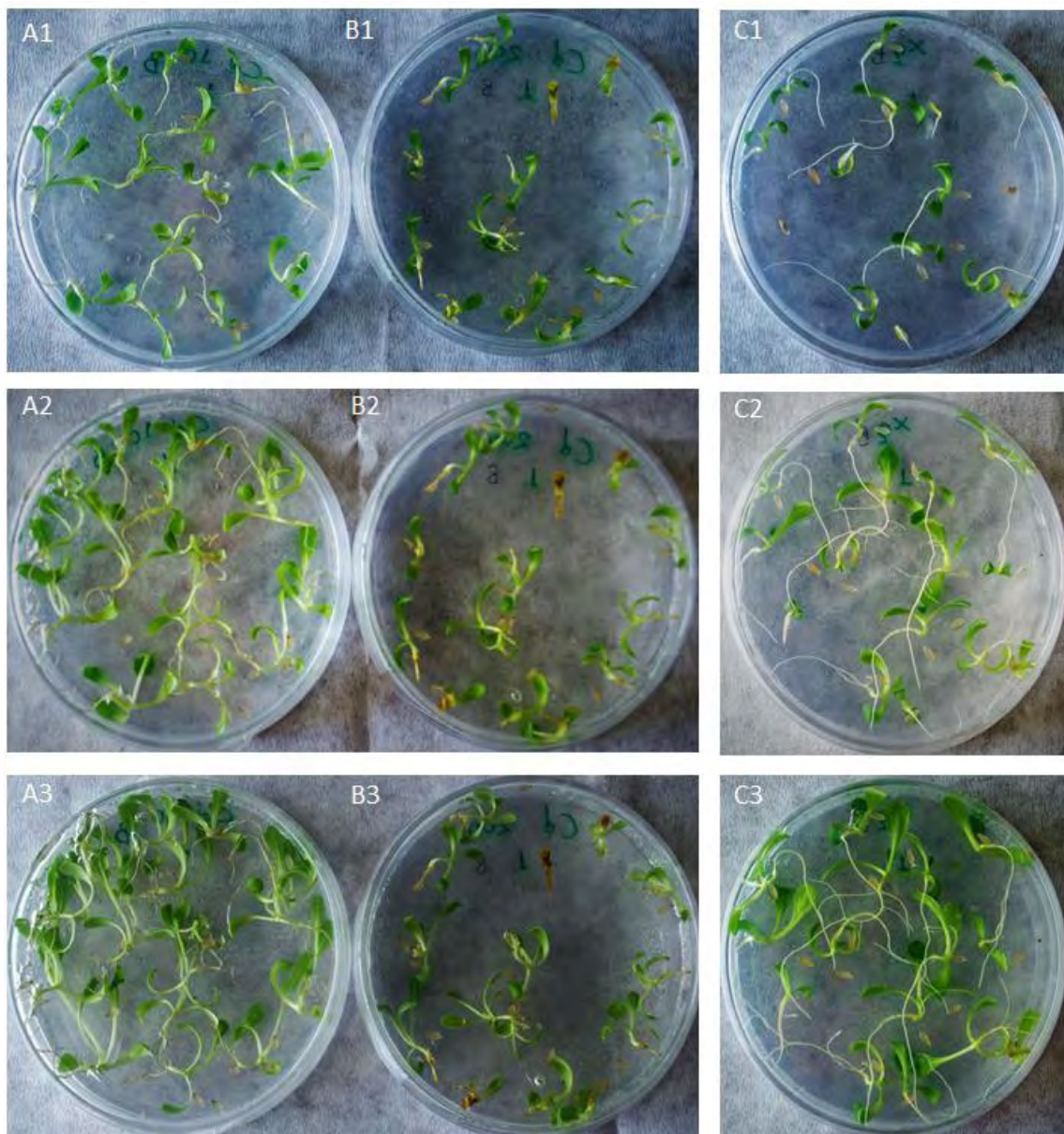


Γράφημα 3.3: Μήκος ρίζας σπορόφυτων μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) κατά τις 5 ημερομηνίες λήψης παρατηρήσεων.

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι στα φυτά μάρτυρες καθώς και στο χαμηλό και μεσαίο επίπεδο στρες αλλά και στη συνδυασμένη καταπόνηση των Cd-Zn, το μήκος της ρίζας παρουσίασε αύξηση που ήταν ανάλογη με την πάροδο του χρόνου (Γράφημα 3.4) (Εικόνα 3.2).



Γράφημα 3.4: Μήκος ρίζας σπορόφυτων μαρουλιού ανά ποικιλία και ημερομηνία παρατήρησης μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)).



Εικόνα 3.2: Απεικόνιση της απόκρισης σπρόρυτων της ποικιλίας *Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana* στο μεσαίο (100 μM), υψηλό (200 μM) επίπεδο καταπόνησης Cd και στη συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn ως προς το γνώρισμα του μήκους ρίζας σε δύο διαφορετικές ημερομηνίες καταπόνησης (πάνω εικόνα= 17^η ημέρα καταπόνησης και δεύτερη κάτω εικόνα= 20^η ημέρα καταπόνησης).

→ Μήκος βλαστού

Το μήκος βλαστού παρουσίασε μείωση ανάλογη με το εφαρμοζόμενο επίπεδο καταπόνησης στο σύνολο των εξεταζόμενων ποικιλιών. Η μεγαλύτερη μείωση στο μήκος βλαστού, συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες, σημειώθηκε κατά την επέμβαση του υψηλού επιπέδου στρες καδμίου (200 μM).

Είναι αξιοσημείωτο ωστόσο ότι η επίδραση της τοξικότητας του μετάλλου σε όλες τις υπό μελέτη ποικιλίες υπήρξε αισθητή ακόμη και στο χαμηλό επίπεδο στρες (50 μM). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, το μήκος βλαστού στο επίπεδο αυτό διέφερε σημαντικά από το μήκος βλαστού στα φυτά μάρτυρες (Πίνακας 3.6). Αντίθετα, η συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn επέδρασε θετικά στο γνώρισμα του μήκους βλαστού, καταδεικνύοντας τη θετική επίδραση του Zn έναντι της τοξικότητας Cd. Συγκεκριμένα, στην επέμβαση αυτή σημειώθηκε το μεγαλύτερο μήκος βλαστού στην πλειονότητα των ποικιλιών, συγκριτικά με τις υπόλοιπες επεμβάσεις, συμπεριλαμβανομένου αυτής του χαμηλού επιπέδου στρες (50 μM) (Πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.6: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του μήκους βλαστού μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)).

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Stem

LSD

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Cd50	.7804*	.03827	.000	.7052	.8556
	Cd100	1.3134*	.03827	.000	1.2382	1.3886
	Cd200	2.1317*	.03827	.000	2.0565	2.2069
	X2\	1.0375*	.03827	.000	.9623	1.1127
Cd50	Control	-.7804*	.03827	.000	-.8556	-.7052
	Cd100	.5330*	.03827	.000	.4578	.6082
	Cd200	1.3513*	.03827	.000	1.2761	1.4265
	X2\	.2571*	.03827	.000	.1819	.3323
Cd100	Control	-1.3134*	.03827	.000	-1.3886	-1.2382

	Cd50	-.5330*	.03827	.000	-.6082	-.4578
	Cd200	.8183*	.03827	.000	.7431	.8935
	X2\	-.2759*	.03827	.000	-.3511	-.2007
Cd200	Control	-2.1317*	.03827	.000	-2.2069	-2.0565
	Cd50	-1.3513*	.03827	.000	-1.4265	-1.2761
	Cd100	-.8183*	.03827	.000	-.8935	-.7431
	X2\	-1.0942*	.03827	.000	-1.1694	-1.0190
X2\	Control	-1.0375*	.03827	.000	-1.1127	-.9623
	Cd50	-.2571*	.03827	.000	-.3323	-.1819
	Cd100	.2759*	.03827	.000	.2007	.3511
	Cd200	1.0942*	.03827	.000	1.0190	1.1694

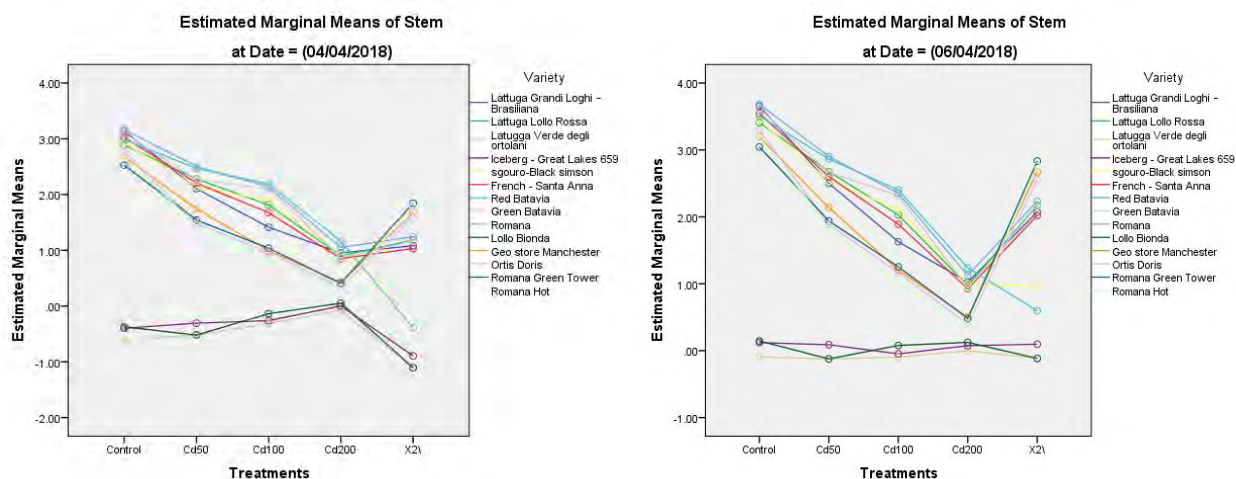
Based on observed means.

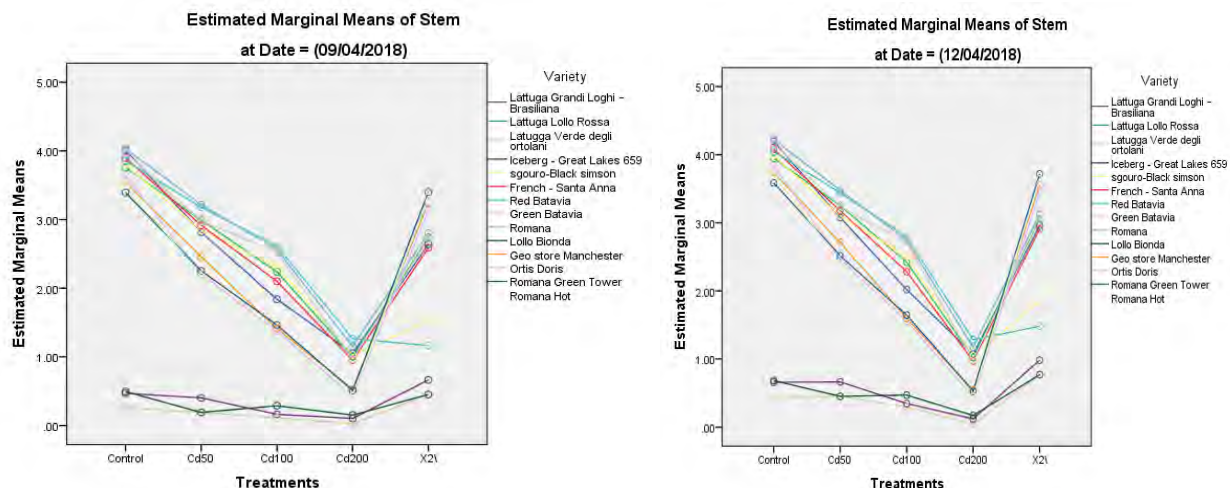
The error term is Mean Square(Error) = .082.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το μήκος ρίζας, το μεγαλύτερο μήκος βλαστού υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης Cd (200 μ M) κατά την τελευταία ημερομηνία παρατήρησης,

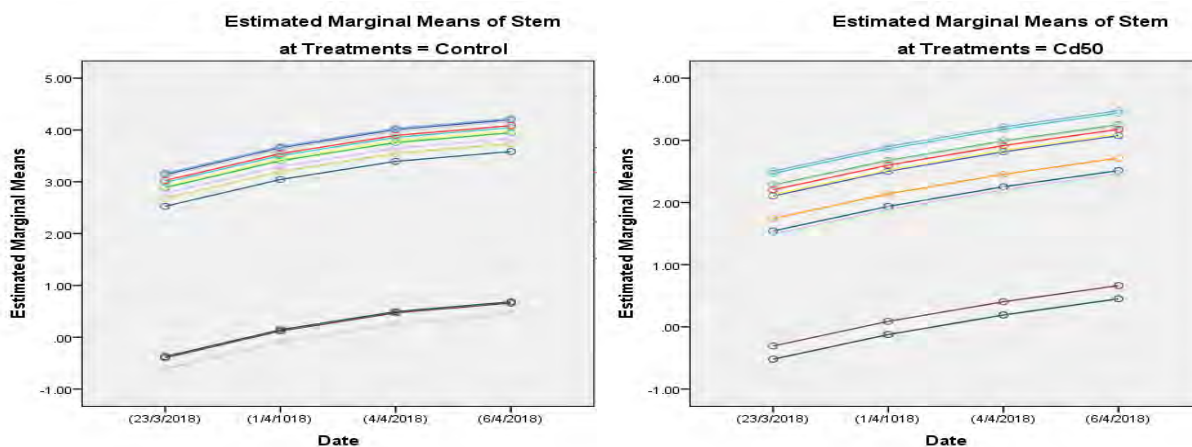
εμφάνισαν οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana και Red Batavia, με μήκος βλαστού έως και 1.2 cm. Αντιθέτως, τη χειρότερη επίδοση ως προς το γνώρισμα αυτό παρουσίασαν οι ποικιλίες Ortis Doris, Romana Green Tower και Romana Hot, με μήκος βλαστού να φθάνει έως και 0.5 cm (Γράφημα 3.5).

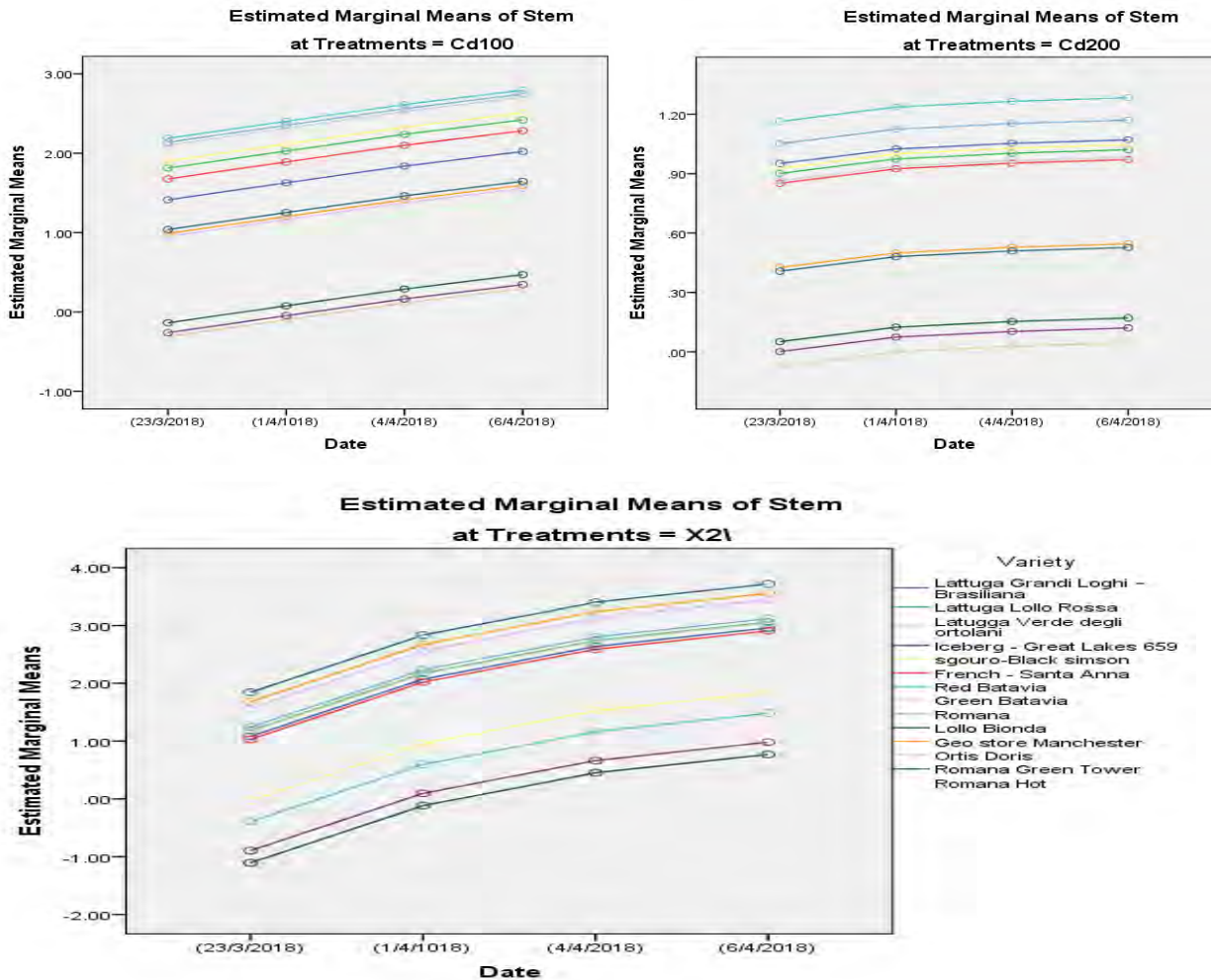




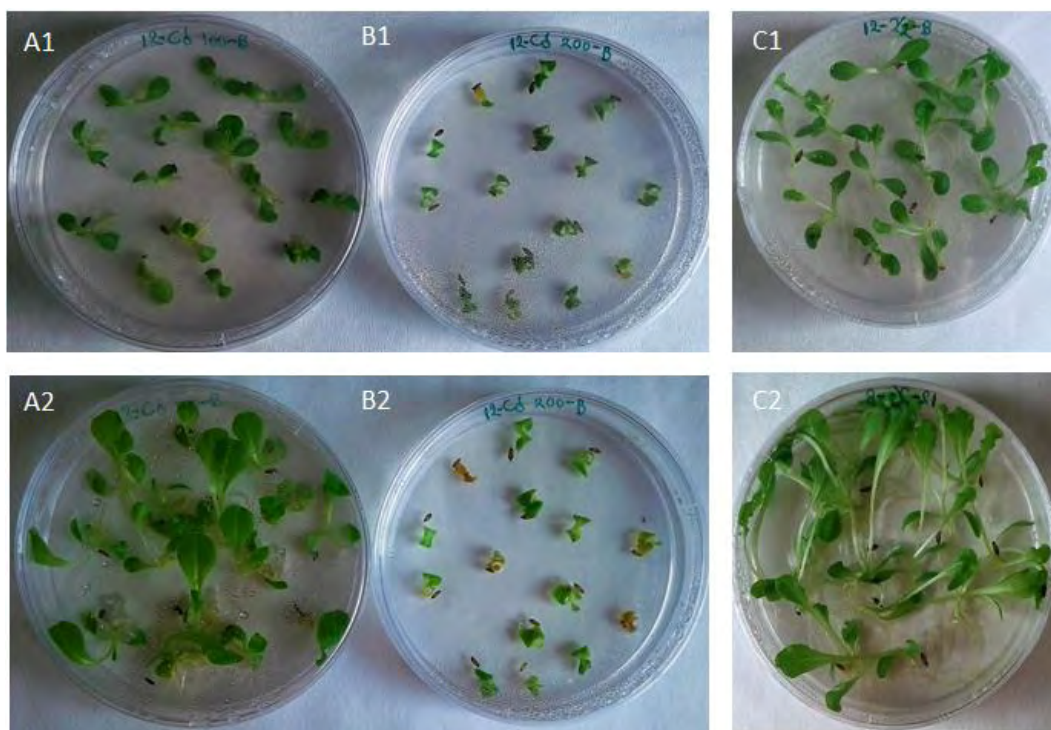
Γράφημα 3.5: Μήκος βλαστού σπορόφυτων μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)) κατά τις 4 ημερομηνίες λήψης παρατηρήσεων.

Αναφορικά με την αύξηση του βλαστού στο χρόνο, σημειώθηκε μια συνεχής αύξηση του μήκους βλαστού σε όλες τις μεταχειρίσεις, με εξαίρεση το υψηλό επίπεδο στρες (200 μM) όπου το μήκος παρέμεινε σταθερό σε όλες τις ημερομηνίες παρατήρησης (Γράφημα 3.6). Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό της αναστολής της ανάπτυξης που προκαλεί η αυξημένη συγκέντρωση καδμίου στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (Εικόνα 3.3).





Γράφημα 3.6: Μήκος βλαστού σπορόφυτων μαρουλιού ανά ποικιλία και ημερομηνία παρατήρησης μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)).

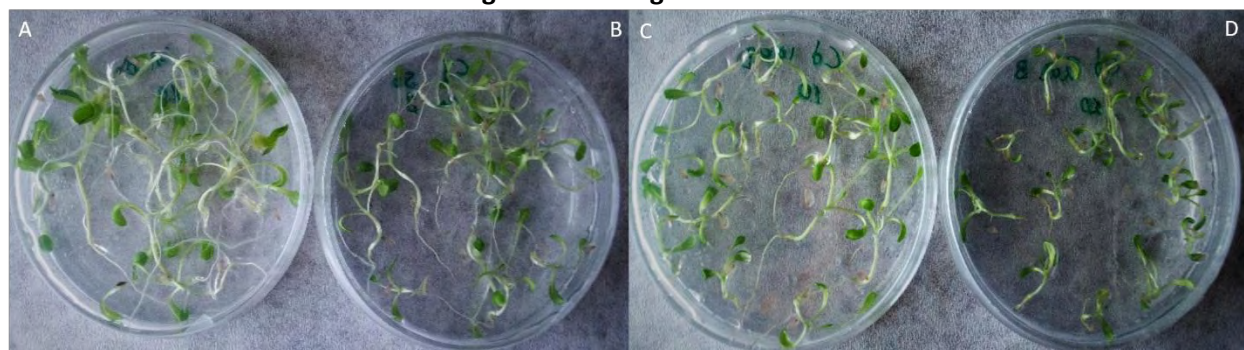


Εικόνα 3.3: Απόκριση των σπορόφυτων της ποικιλίας Geo store Manchester στο μεσαίο (A) και υψηλό επίπεδο στρες Cd (B) και στη συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn (C) ως προς την ανάπτυξη της ρίζας σε δύο διαφορετικές ημερομηνίες παρατήρησης (A1, B1, C1: 15^η ημέρα καταπόνησης (04/04/2018) και A2, B2, C2: 20^η ημέρα καταπόνησης (09/04/2018)).

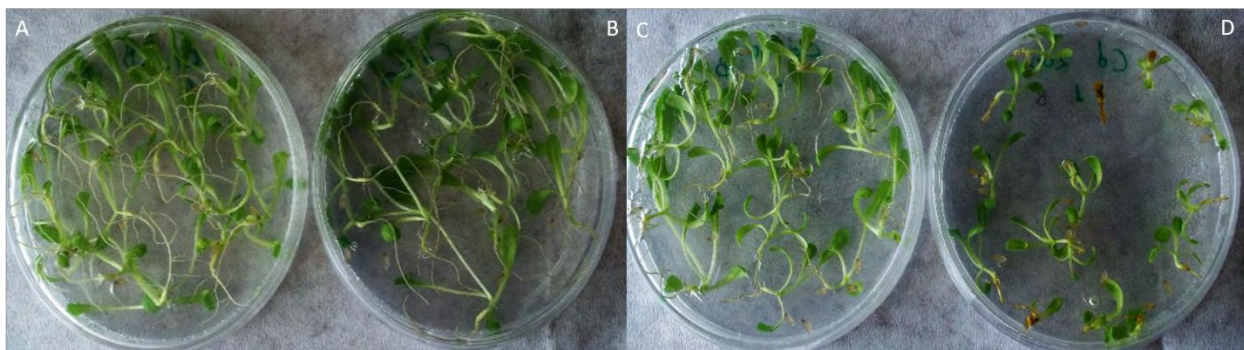
Στο σύνολό τους τα ευρήματα από την *in vitro* αξιολόγηση των 14 ποικιλιών μαρουλιού καταδεικνύουν την υπεροχή των ποικιλιών Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana και Red Batavia, υπεροχή που εκφράστηκε μέσω του ικανοποιητικού ποσοστού βλάστησης και μειωμένης τοξικής επίδρασης ως προς την αύξηση του μήκους ρίζας και βλαστού στα εφαρμοζόμενα επίπεδα καταπόνησης.

Τα συνολικά αποτελέσματα από την αξιολόγηση στη φάση της βλάστησης παρείχαν τη δυνατότητα διάκρισης των φαινοτύπων ανθεκτικότητας και ευαισθησίας στο στάδιο αυτό και επιπλέον, επέτρεψαν την κατηγοριοποίηση των ποικιλιών βάσει της ανθεκτικότητάς τους (Εικόνα 3.4).

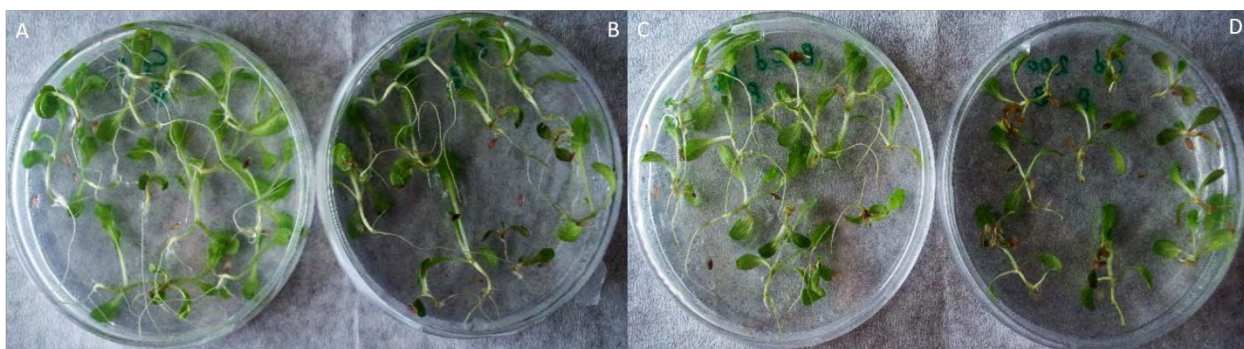
Latuga Grandhi Loghi Brasilliana



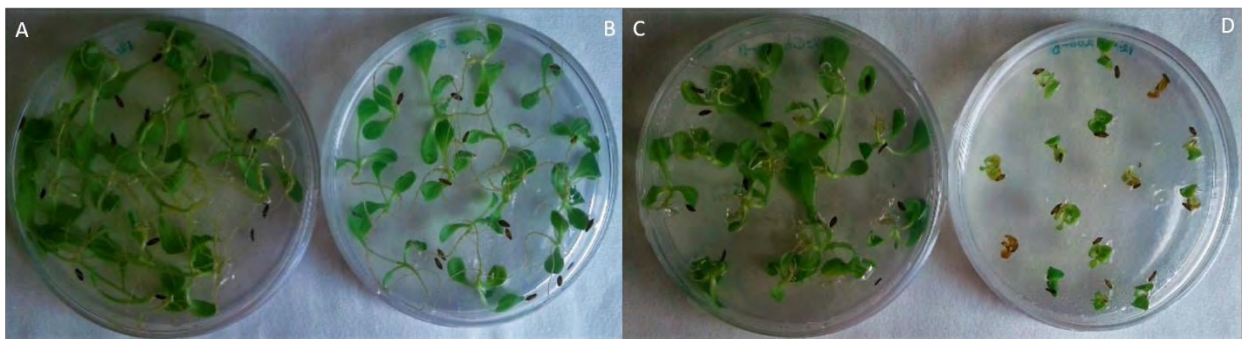
Red Batavia

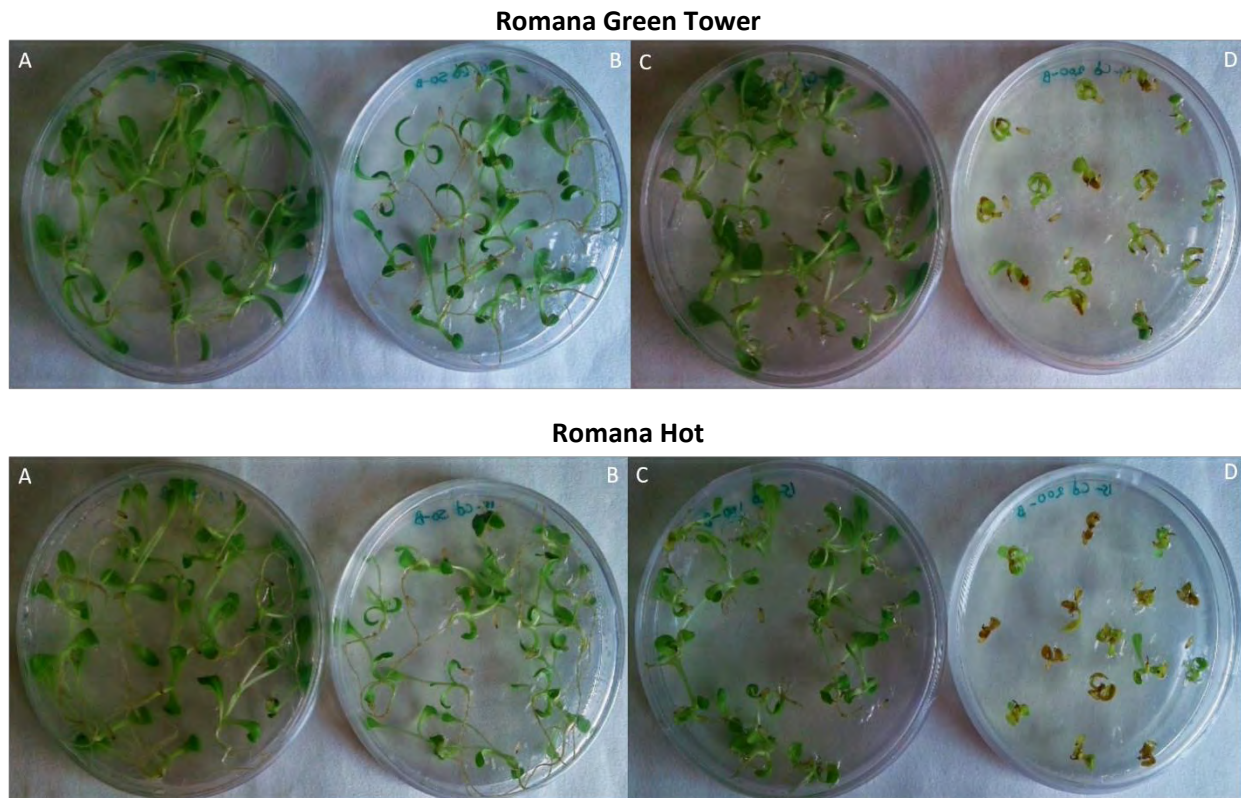


Romana



Geo store Manchester





Εικόνα 3.4: Απεικόνιση των 6 επιλεγμένων ποικιλιών που κατηγοριοποιήθηκαν ως ανθεκτικές, μέτριας ανθεκτικότητας και ευαίσθητες στα υπό μελέτη επίπεδα καταπόνησης καδμίου. Α. Control, Β. Cd: 50 μ M, C. Cd: 100 μ M, D. Cd: 200 μ M κατά την τελευταία ημερομηνία παρατήρησης (23^η ημέρα καταπόνησης) (12/04/2018).

Βάσει των συνολικών ευρημάτων, επιλέχθηκαν 6 ποικιλίες για περαιτέρω αξιολόγηση σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια: i) 2 ανθεκτικές, ii) 2 μέτριας ανθεκτικότητας και iii) 2 ευαίσθητες (Σχήμα 3.1).

Ανθεκτικές	Μέτριας ανθεκτικότητας	Ευαίσθητες
<ul style="list-style-type: none"> • Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana • Red Batavia 	<ul style="list-style-type: none"> • Romana • Geo store Manchester 	<ul style="list-style-type: none"> • Romana Green Tower • Romana Hot

Σχήμα 3.1: Ποικιλίες μαρουλιού που επιλέχθηκαν για περαιτέρω αξιολόγηση σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια.

3.2 Καταπόνηση από βαρέα μέταλλα σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια

3.2.1 Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στο χλωρό βάρος φυτών μαρουλιού

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τη μεταβλητή του χλωρού βάρους μεταξύ των έξι ποικιλιών, υπογραμμίζουν τη σημαντική επίδραση που ασκούν οι παράγοντες επέμβαση με κάδμιο, ποικιλία καθώς και η αλληλεπίδραση επέμβασης-ποικιλίας στην ομαλή αύξηση και ανάπτυξη των φυτών (Πίνακας 3.7). Ως προς την επίδραση του επιπέδου καταπόνησης, στατιστικά σημαντικές διαφορές, σε σχέση με τους μάρτυρες, σημειώθηκαν στο μεσαίο και στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης αλλά και στη συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn (Πίνακας 3.7). Αυτό καταδεικνύει πως η μικρή συγκέντρωση καδμίου, δεν έδρασε τοξικά και δεν επηρέασε αρνητικά καμία ποικιλία ως προς την μεταβλητή του χλωρού βάρους

Πίνακας 3.7: Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο χλωρό βάρος φυτών μαρουλιού σε 6 διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες.

Tests of Between-Subjects Effects

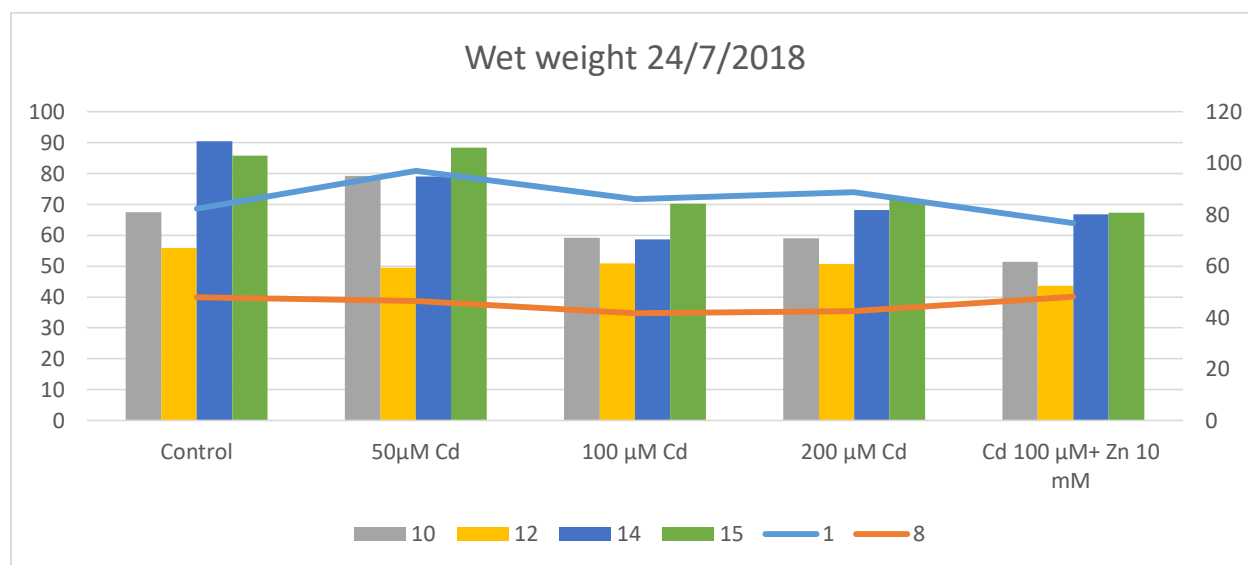
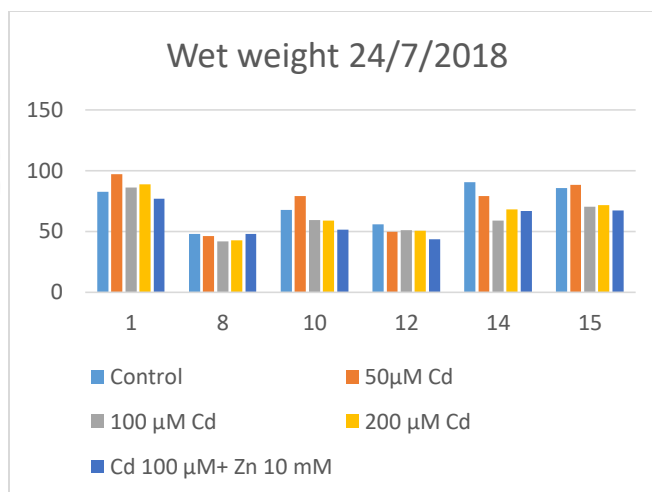
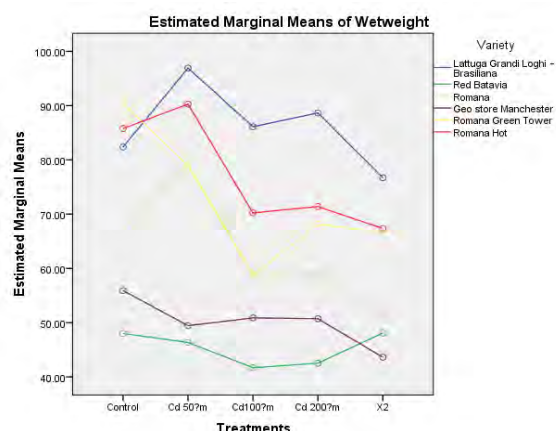
Dependent Variable: Wetweight

Source		Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	518649.157	1	518649.157	10721.682	.000
	Error	145.122	3	48.374 ^a		
Treatments	Hypothesis	4034.736	4	1008.684	13.465	.000
	Error	898.937	12	74.911 ^b		
Variety	Hypothesis	25144.503	5	5028.901	59.740	.000
	Error	6313.494	75	84.180 ^c		
Rep	Hypothesis	145.122	3	48.374	.646	.600
	Error	898.937	12	74.911 ^b		
Treatments * Rep	Hypothesis	898.937	12	74.911	.890	.561
	Error	6313.494	75	84.180 ^c		
Treatments * Variety	Hypothesis	3235.922	20	161.796	1.922	.023
	Error	6313.494	75	84.180 ^c		

- a. MS(Rep)
- b. MS(Treatments * Rep)
- c. MS(Error)

Σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα από την *in vitro* αξιολόγηση των ποικιλιών στη φάση της βλάστησης, οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana και Red Batavia εμφάνισαν τη μικρότερη απώλεια χλωρού βάρους σε όλες τις συγκεντρώσεις καδμίου σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Συγκεκριμένα, το χλωρό βάρος των φυτών μαρτύρων για τις ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana και Red Batavia ανήλθε στα 83 και 53 g αντίστοιχα. Για την ποικιλία Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana, οι αντίστοιχες τιμές υπό συνθήκες καταπόνησης κυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα με τους μάρτυρες (83 g), ενώ στο χαμηλό επίπεδο στρες Cd (50 μ M) σημειώθηκε αύξηση του χλωρού βάρους, συγκριτικά με τους μάρτυρες, περίπου κατά 16g, καταδεικνύοντας μια μορφή ανθεκτικότητας (Γράφημα 3.7). Αντίστοιχα, στην ποικιλία Red Batavia το χλωρό βάρος παρέμεινε σε παρόμοια επίπεδα με τους μάρτυρες στο χαμηλό επίπεδο στρες, ενώ παρουσίασε μια ελάχιστη, μη στατιστικά σημαντική, τάση μείωσης της τάξεως των 5g και 6g στο μεσαίο (Cd 100 μ M) και υψηλό επίπεδο στρες (Cd 200 μ M) αντίστοιχα. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana και Red Batavia χαρακτηρίζονται από ένα ορισμένο επίπεδο ανθεκτικότητας έναντι της καταπόνησης από κάδμιο.

Σε απόκριση στην τοξικότητα του καδμίου, οι υπόλοιπες ποικιλίες εμφάνισαν μεγαλύτερη μείωση του χλωρού βάρους συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες (Γράφημα 3.7). Ως προς τους γονότυπους που χαρακτηρίστηκαν ως μέτριας ανθεκτικότητας, η ποικιλία Geo store Manchester εμφάνισε καλύτερη επίδοση συγκριτικά με τη Romana. Παρά το γεγονός ότι η Geo store Manchester παρουσίασε ορισμένη ευαισθησία στο χαμηλό επίπεδο στρες Cd (50 μ M), εκφρασμένη ως μείωση του χλωρού βάρους κατά περίπου 8g σε σύγκριση με τους μάρτυρες, η διαφορά αυτή έμεινε αμετάβλητη στα υψηλότερα επίπεδα καταπόνησης, παρέχοντας έτσι ένα είδος ανθεκτικότητας στα επίπεδα αυτά. Αντίθετα, η Romana επέδειξε μια υπεροχή στο χαμηλό επίπεδο στρες Cd (50 μ M), καθώς εμφάνισε αυξημένο χλωρό βάρος συγκριτικά με τους μάρτυρες, ενώ στο μεσαίο (100 μ M) και στο υψηλό επίπεδο στρες Cd (200 μ M) καταγράφηκε μείωση του χλωρού βάρους της τάξης των 10 και 20 g αντίστοιχα. Βάσει των ευρημάτων αυτών, προκύπτει ότι η ποικιλία Romana χαρακτηρίζεται από ευαισθησία στις υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου.



Γράφημα 3.7: Χλωρό βάρος ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) κατά την ημέρα κοπής (24/07/2018). Κάτω Γράφημα: Χλωρό βάρος ανά ποικιλία συναρτήσει των αντίστοιχων τιμών για τις ποικιλίες Lattuga Grandi-Brasiliana (1) και Red Batavia (8).

Αναφορικά με τις ποικιλίες Romana Green Tower και Romana Hot, που χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στη φάση της βλάστησης, η επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα ήταν ανάλογη του επιπέδου του. Τα φυτά μάρτυρες των εν λόγω ποικιλιών εμφάνισαν τιμές χλωρού βάρους περίπου 95 και 90 g αντίστοιχα, ενώ τα φυτά που δέχθηκαν καταπόνηση παρουσίασαν σημαντικά μειωμένες τιμές. Ειδικότερα, ποικιλία Romana Green Tower επηρεάστηκε δραστικά από την

καταπόνηση ακόμη και στη μικρότερη συγκέντρωση καδμίου (50 μM), όπου εμφάνισε μείωση του χλωρού βάρους, περίπου κατά 22 g, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Η ποικιλία Romana Hot κατέδειξε ορισμένη ανθεκτικότητα στο χαμηλό επίπεδο στρες, ενώ στα υψηλότερα επίπεδα (100, 200 μM) παρουσίασε σημαντική μείωση του χλωρού βάρους, έως και 20 g, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, οι συγκεκριμένες ποικιλίες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη μεταβλητή του χλωρού βάρους και παράλληλα, εμφάνισαν τις μικρότερες τιμές χλωρού βάρους στα υψηλά επίπεδα καταπόνησης Cd (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.8: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του χλωρού βάρους μεταξύ των 6 διαφορετικών ποικιλιών.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Wetweight

LSD

(I) Variety	(J) Variety	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	Red Batavia	40.8200*	2.90138	.000	35.0402	46.5998
	Romana	22.8850*	2.90138	.000	17.1052	28.6648
	Geo store Manchester	36.0350*	2.90138	.000	30.2552	41.8148
	Romana Green Tower	13.5600*	2.90138	.000	7.7802	19.3398
	Romana Hot	9.1450*	2.90138	.002	3.3652	14.9248
Red Batavia	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-40.8200*	2.90138	.000	-46.5998	-35.0402
	Romana	-17.9350*	2.90138	.000	-23.7148	-12.1552
	Geo store Manchester	-4.7850	2.90138	.103	-10.5648	.9948
	Romana Green Tower	-27.2600*	2.90138	.000	-33.0398	-21.4802
	Romana Hot	-31.6750*	2.90138	.000	-37.4548	-25.8952
Romana	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-22.8850*	2.90138	.000	-28.6648	-17.1052
	Red Batavia	17.9350*	2.90138	.000	12.1552	23.7148
	Geo store Manchester	13.1500*	2.90138	.000	7.3702	18.9298
	Romana Green Tower	-9.3250*	2.90138	.002	-15.1048	-3.5452
	Romana Hot	-13.7400*	2.90138	.000	-19.5198	-7.9602

Geo store Manchester	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-36.0350*	2.90138	.000	-41.8148	-30.2552
	Red Batavia	4.7850	2.90138	.103	-.9948	10.5648
	Romana	-13.1500*	2.90138	.000	-18.9298	-7.3702
	Romana Green Tower	-22.4750*	2.90138	.000	-28.2548	-16.6952
	Romana Hot	-26.8900*	2.90138	.000	-32.6698	-21.1102
Romana Green Tower	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-13.5600*	2.90138	.000	-19.3398	-7.7802
	Red Batavia	27.2600*	2.90138	.000	21.4802	33.0398
	Romana	9.3250*	2.90138	.002	3.5452	15.1048
	Geo store Manchester	22.4750*	2.90138	.000	16.6952	28.2548
	Romana Hot	-4.4150	2.90138	.132	-10.1948	1.3648
Romana Hot	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-9.1450*	2.90138	.002	-14.9248	-3.3652
	Red Batavia	31.6750*	2.90138	.000	25.8952	37.4548
	Romana	13.7400*	2.90138	.000	7.9602	19.5198
	Geo store Manchester	26.8900*	2.90138	.000	21.1102	32.6698
	Romana Green Tower	4.4150	2.90138	.132	-1.3648	10.1948

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 84.180.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Αναφορικά με τη συνδυασμένη καταπόνηση καδμίου και ψευδαργύρου, τα αποτελέσματα της ανάλυσης υποδεικνύουν ότι ο Zn δεν επέδρασε θετικά ως προς την τοξικότητα του καδμίου στην μεταβλητή του χλωρού βάρους στο σύνολο των εξεταζόμενων ποικιλιών. Με εξαίρεση την ποικιλία Red Batavia, όπου ο συνδυασμός Cd-Zn επηρέασε θετικά την μεταβλητή του χλωρού βάρους σημειώνοντας υψηλότερη τιμή συγκριτικά με τους μάρτυρες, στις ποικιλίες Lattuga Grandhi-Brasiliana και Geo store Manchester οδήγησε σε μείωση του χλωρού βάρους κατά περίπου 12 g σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Στις υπόλοιπες ποικιλίες, η συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn δεν επέφερε στατιστικές σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το μεσαίο επίπεδο στρες Cd (100 μ M) (Πίνακας 3.9).

Πίνακας 3.9: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του χλωρού βάρους μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)).

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Wetweight

LSD

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Cd 50?m	-1.8667	2.64858	.483	-7.1429	3.4096
	Cd100?m	10.5292*	2.64858	.000	5.2529	15.8054
	Cd 200?m	8.2542*	2.64858	.003	2.9779	13.5304
	X2	12.6833*	2.64858	.000	7.4071	17.9596
Cd 50?m	Control	1.8667	2.64858	.483	-3.4096	7.1429
	Cd100?m	12.3958*	2.64858	.000	7.1196	17.6721
	Cd 200?m	10.1208*	2.64858	.000	4.8446	15.3971
	X2	14.5500*	2.64858	.000	9.2738	19.8262
Cd100?m	Control	-10.5292*	2.64858	.000	-15.8054	-5.2529
	Cd 50?m	-12.3958*	2.64858	.000	-17.6721	-7.1196
	Cd 200?m	-2.2750	2.64858	.393	-7.5512	3.0012
	X2	2.1542	2.64858	.419	-3.1221	7.4304
Cd 200?m	Control	-8.2542*	2.64858	.003	-13.5304	-2.9779
	Cd 50?m	-10.1208*	2.64858	.000	-15.3971	-4.8446
	Cd100?m	2.2750	2.64858	.393	-3.0012	7.5512
	X2	4.4292	2.64858	.099	-.8471	9.7054
X2	Control	-12.6833*	2.64858	.000	-17.9596	-7.4071
	Cd 50?m	-14.5500*	2.64858	.000	-19.8262	-9.2738
	Cd100?m	-2.1542	2.64858	.419	-7.4304	3.1221
	Cd 200?m	-4.4292	2.64858	.099	-9.7054	.8471

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 84.180.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

3.2.2 Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στο ξηρό βάρος φυτών μαρουλιού

Η επόμενη μεταβλητή που αξιολογήθηκε είναι το ξηρό βάρος, ενώ οι συγκρίσεις αφορούσαν στις διαφορετικές ποικιλίες αλλά και στις διαφορετικές επεμβάσεις καταπόνησης από βαρέα μέταλλα.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης καταδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικής επίδρασης σε επίπεδο

ποικιλίας, επέμβασης αλλά και αλληλεπίδρασης ποικιλίας-επέμβασης στο ξηρό βάρος ων φυτών μαρουλιού (Πίνακας 3.10).

Πίνακας 3.10: Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο ξηρό βάρος φυτών μαρουλιού σε 6 διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Dryweight

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	10081.500	1	10081.500	8619.327	.000
	Error	3.509	3	1.170 ^a		
Variety	Hypothesis	282.227	5	56.445	45.719	.000
	Error	92.596	75	1.235 ^b		
Treatments	Hypothesis	59.735	4	14.934	6.065	.007
	Error	29.547	12	2.462 ^c		
Repetition	Hypothesis	3.509	3	1.170	.475	.705
	Error	29.547	12	2.462 ^c		
Treatments * Repetition	Hypothesis	29.547	12	2.462	1.994	.036
	Error	92.596	75	1.235 ^b		
Variety * Treatments	Hypothesis	97.575	20	4.879	3.952	.000
	Error	92.596	75	1.235 ^b		

a. MS(Repetition)

b. MS(Error)

c. MS(Treatments * Repetition)

Ως προς τις διαφορετικές επεμβάσεις, προκύπτει ότι ο μάρτυρας, το χαμηλό επίπεδο καταπόνησης Cd (50 μ M) αλλά και η συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn δεν παρουσιάζουν σημαντικά διαφορά ως προς την μεταβλητή του ξηρού βάρους για το σύνολο των εξεταζόμενων ποικιλιών. Το ίδιο παρατηρείται και ανάμεσα στο μεσαίο (100 μ M) και υψηλό επίπεδο στρες (200 μ M). Παρόλα αυτά, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων C, 50 μ M Cd και 100, 200

μM Cd, τονίζοντας την αρνητική επίδραση της τοξικότητας καδμίου στην μεταβλητή του ξηρού βάρους στις υπό μελέτη ποικιλίες μαρουλιού (Πίνακας 3.11).

Πίνακας 3.11: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ξηρού βάρους μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μM, X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)).

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Dryweight

LSD

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Cd 50?m	-.2917	.32076	.366	-.9306	.3473
	Cd 100?m	1.2667*	.32076	.000	.6277	1.9056
	Cd 200 ?m	1.5083*	.32076	.000	.8694	2.1473
	Cd 100?m Zn10mm	.3333	.32076	.302	-.3056	.9723
Cd 50?m	Control	.2917	.32076	.366	-.3473	.9306
	Cd 100?m	1.5583*	.32076	.000	.9194	2.1973
	Cd 200 ?m	1.8000*	.32076	.000	1.1610	2.4390
	Cd 100?m Zn10mm	.6250	.32076	.055	-.0140	1.2640
Cd 100?m	Control	-1.2667*	.32076	.000	-1.9056	-.6277
	Cd 50?m	-1.5583*	.32076	.000	-2.1973	-.9194
	Cd 200 ?m	.2417	.32076	.454	-.3973	.8806
	Cd 100?m Zn10mm	-.9333*	.32076	.005	-1.5723	-.2944
Cd 200 ?m	Control	-1.5083*	.32076	.000	-2.1473	-.8694
	Cd 50?m	-1.8000*	.32076	.000	-2.4390	-1.1610
	Cd 100?m	-.2417	.32076	.454	-.8806	.3973
	Cd 100?m Zn10mm	-1.1750*	.32076	.000	-1.8140	-.5360
Cd 100?m Zn10mm	Control	-.3333	.32076	.302	-.9723	.3056
	Cd 50?m	-.6250	.32076	.055	-1.2640	.0140
	Cd 100?m	.9333*	.32076	.005	.2944	1.5723

Cd 200 ?m	1.1750*	.32076	.000	.5360	1.8140
-----------	---------	--------	------	-------	--------

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.235.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Όσον αφορά τους διαφορετικούς γονότυπους, οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana, Red Batavia και Geo store Manchester διέφεραν σημαντικά από όλες τις ποικιλίες, ενώ παράλληλα συνιστούν και τις ποικιλίες που παρουσίασαν και το υψηλότερο επίπεδο ανθεκτικότητας συγκριτικά με τις υπόλοιπες ποικιλίες. Αντίθετα, οι υπόλοιπες ποικιλίες δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ως προς την μεταβλητή του ξηρού βάρους (Πίνακας 3.12).

Πίνακας 3.6: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ξηρού βάρους μεταξύ των 6 διαφορετικών ποικιλιών.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Dryweight

LSD

(I) Variety	(J) Variety	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	Red Batavia	2.3850*	.35137	.000	1.6850	3.0850
	Romana	-1.2550*	.35137	.001	-1.9550	-.5550
	Geo store Manchester	-2.5400*	.35137	.000	-3.2400	-1.8400
	Romana Green Tower	-.7800*	.35137	.029	-1.4800	-.0800
	Romana Hot	-1.3850*	.35137	.000	-2.0850	-.6850
	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-2.3850*	.35137	.000	-3.0850	-1.6850
Red Batavia	Romana	-3.6400*	.35137	.000	-4.3400	-2.9400
	Geo store Manchester	-4.9250*	.35137	.000	-5.6250	-4.2250
	Romana Green Tower	-3.1650*	.35137	.000	-3.8650	-2.4650
	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-2.3850*	.35137	.000	-3.0850	-1.6850
	Romana Hot	-1.3850*	.35137	.000	-2.0850	-.6850

	Romana Hot	-3.7700*	.35137	.000	-4.4700	-3.0700
Romana	Lattuga Grandi					
	Loghi –	1.2550*	.35137	.001	.5550	1.9550
	Brasiliana					
	Red Batavia	3.6400*	.35137	.000	2.9400	4.3400
	Geo store					
	Manchester	-1.2850*	.35137	.000	-1.9850	-.5850
	Romana Green					
	Tower	.4750	.35137	.180	-.2250	1.1750
	Romana Hot	-.1300	.35137	.712	-.8300	.5700
Geo store Manchester	Lattuga Grandi					
	Loghi –	2.5400*	.35137	.000	1.8400	3.2400
	Brasiliana					
	Red Batavia	4.9250*	.35137	.000	4.2250	5.6250
	Romana	1.2850*	.35137	.000	.5850	1.9850
	Romana Green					
	Tower	1.7600*	.35137	.000	1.0600	2.4600
	Romana Hot	1.1550*	.35137	.002	.4550	1.8550
Romana Green Tower	Lattuga Grandi					
	Loghi –	.7800*	.35137	.029	.0800	1.4800
	Brasiliana					
	Red Batavia	3.1650*	.35137	.000	2.4650	3.8650
	Romana	-.4750	.35137	.180	-1.1750	.2250
	Geo store					
	Manchester	-1.7600*	.35137	.000	-2.4600	-1.0600
	Romana Hot	-.6050	.35137	.089	-1.3050	.0950
Romana Hot	Lattuga Grandi					
	Loghi –	1.3850*	.35137	.000	.6850	2.0850
	Brasiliana					
	Red Batavia	3.7700*	.35137	.000	3.0700	4.4700
	Romana	.1300	.35137	.712	-.5700	.8300
	Geo store					
	Manchester	-1.1550*	.35137	.002	-1.8550	-.4550
	Romana Green					
	Tower	.6050	.35137	.089	-.0950	1.3050

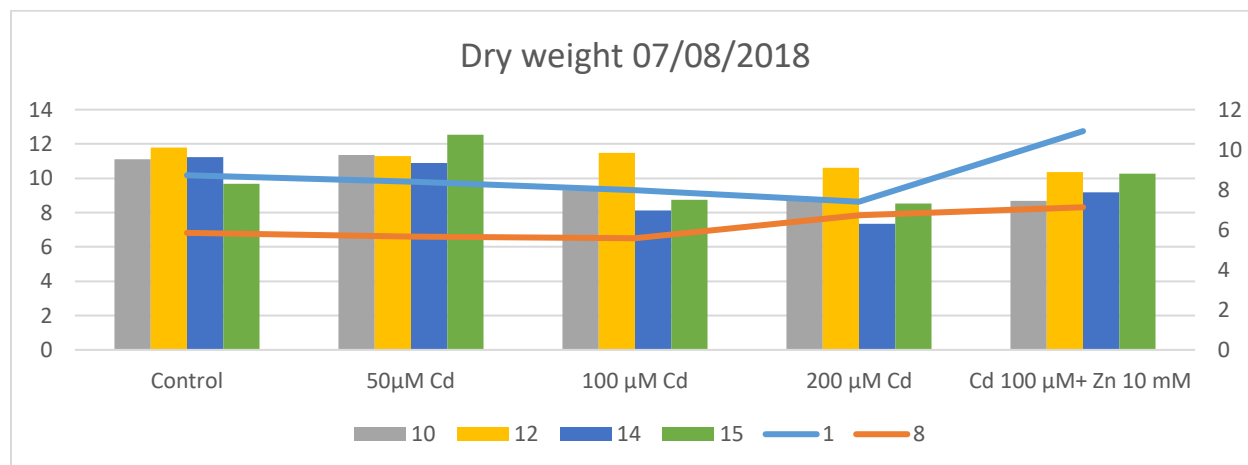
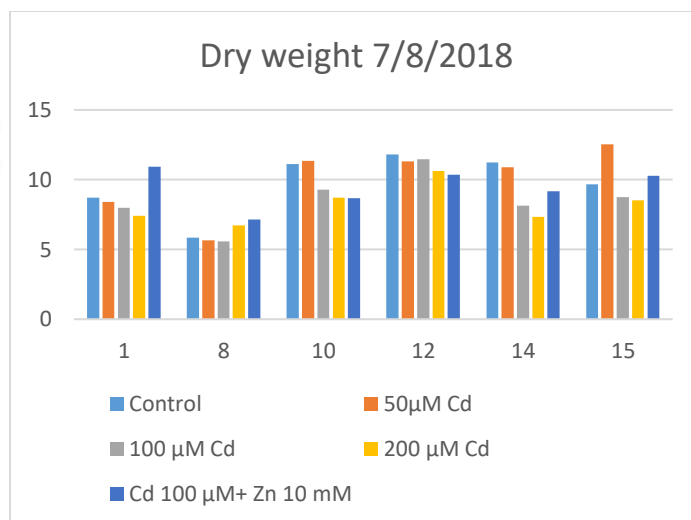
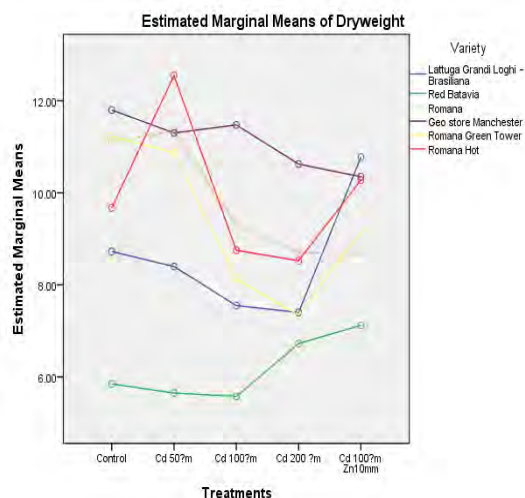
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.235.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Ειδικότερα, στα φυτά μάρτυρες, υψηλότερο ξηρό βάρος παρουσίασαν οι ποικιλίες Geo store Manchester, Romana Green Tower και Romana, ακολουθούμενες από τις ποικιλίες Romana Hot, Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana και Red Batavia. Παρουσία καταπόνησης, παρατηρείται πως οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana και Red Batavia εμφάνισαν τη μικρότερη μείωση ξηρού βάρους, συγκριτικά με τους μάρτυρες, τόσο στο χαμηλό όσο και στο υψηλό επίπεδο στρες Cd. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι στο υψηλό επίπεδο στρες, η ποικιλία Red Batavia εμφάνισε μια αύξηση ξηράς ουσίας, υποδεικνύοντας την ανθεκτικότητά της έναντι της τοξικότητας καδμίου. Με την σειρά της, η Geo store Manchester η οποία χαρακτηρίστηκε ως ποικιλία μέτριας ανθεκτικότητας, παρουσίασε ένα είδος ανοχής στην καταπόνηση, καθώς η μείωση ξηρού βάρους δεν υπήρξε ανάλογη του επιπέδου στρες, ακόμη και στο υψηλό επίπεδο (Γράφημα 3.8). Αντίθετα, οι ποικιλίες Romana, Romana Hot και Romana Green Tower εμφάνισαν μείωση ξηράς ουσίας ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης του καδμίου, καταδεικνύοντας ένα επίπεδο ευαισθησίας, με τη Romana Hot αρχικά να εμφανίζει μια αύξηση ξηρής ουσίας στα 50 μM καδμίου η οποία μειώθηκε αισθητά με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης.

Η συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn, φάνηκε να διαδραματίζει θετικό ρόλο στις περισσότερες ποικιλίες. Ειδικότερα, οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana, Red Batavia, Romana Green Tower και Romana Hot εμφάνισαν μια τάση αύξησης ξηράς ουσίας, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές υπό συνθήκες καταπόνησης στο μεσαίο και υψηλό επίπεδο, υπογραμμίζοντας τη θετική επίδραση του Zn έναντι της τοξικότητας Cd. Αντίθετα, οι ποικιλίες Romana και Geo store Manchester δεν επηρεάστηκαν θετικά κατά τη συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn, καθώς το ξηρό βάρος εμφάνισε μείωση που υπήρξε ανάλογη με αυτή που καταγράφηκε στο υψηλό επίπεδο στρες Cd (200 μM).



Γράφημα 3.8: Ξηρό βάρος ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) (07/08/2018). Κάτω Γράφημα: Ξηρό βάρος ανά ποικιλία συναρτήσει των αντίστοιχων τιμών για τις ποικιλίες Lattuga Grandi-Brasiliana (1) και Red Batavia (8).

3.2.3 Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στο ύψος των φυτών μαρουλιού

Η επόμενη μεταβλητή που μελετήθηκε στο πλαίσιο αξιολόγησης των έξι επιλεγμένων γονοτύπων μαρουλιού σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια είναι το ύψος των φυτών. Στο πλαίσιο αυτό, η ανάλυση κατέδειξε πως το ύψος επηρεάστηκε σημαντικά από την ποικιλία, την επέμβαση καταπόνησης από βαρέα μέταλλα καθώς και την αλληλεπίδραση ποικιλίας-επέμβασης (Πίνακας 3.13).

Πίνακας 3.7: Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο ύψος φυτών μαρουλιού σε 6 διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Height

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	111256.788	1	111256.788	23179.079	.000
	Error	14.400	3	4.800 ^a		
Treatments	Hypothesis	26.261	4	6.565	4.544	.018
	Error	17.339	12	1.445 ^b		
Variety	Hypothesis	2325.648	5	465.130	143.467	.000
	Error	988.827	305	3.242 ^c		
Date	Hypothesis	4965.266	2	2482.633	765.759	.000
	Error	988.827	305	3.242 ^c		
Rep	Hypothesis	14.400	3	4.800	3.322	.057
	Error	17.339	12	1.445 ^b		
Treatments * Variety	Hypothesis	48.417	20	2.421	.747	.776
	Error	988.827	305	3.242 ^c		
Treatments * Date	Hypothesis	30.984	8	3.873	1.195	.302
	Error	988.827	305	3.242 ^c		
Treatments * Rep	Hypothesis	17.339	12	1.445	.446	.944
	Error	988.827	305	3.242 ^c		

a. MS(Rep)

b. MS(Treatments * Rep)

c. MS(Error)

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της ανάλυσης καταδεικνύουν ότι η μεταχείριση του μάρτυρα και του χαμηλού επιπέδου στρες Cd (50 μ M) διέφεραν στατιστικά σημαντικά από το υψηλό επίπεδο στρες (200 μ M), καταδεικνύοντας την αρνητική επίδραση του Cd σε υψηλά επίπεδα καταπόνησης. Από την άλλη μεριά, οι επεμβάσεις μεσαίου επιπέδου στρες (100 μ M) και συνδυασμένης καταπόνησης Cd-Zn δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις (Πίνακας 3.14).

Πίνακας 3.8: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ύψους μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)).

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Height

LSD

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Cd50	-.0014	.30010	.996	-.5919	.5891
	Cd100	.4111	.30010	.172	-.1794	1.0016
	Cd200	.7139*	.30010	.018	.1234	1.3044
	X2	.2347	.30010	.435	-.3558	.8252
Cd50	Control	.0014	.30010	.996	-.5891	.5919
	Cd100	.4125	.30010	.170	-.1780	1.0030
	Cd200	.7153*	.30010	.018	.1248	1.3058
	X2	.2361	.30010	.432	-.3544	.8266
Cd100	Control	-.4111	.30010	.172	-1.0016	.1794
	Cd50	-.4125	.30010	.170	-1.0030	.1780
	Cd200	.3028	.30010	.314	-.2877	.8933
	X2	-.1764	.30010	.557	-.7669	.4141
Cd200	Control	-.7139*	.30010	.018	-1.3044	-.1234
	Cd50	-.7153*	.30010	.018	-1.3058	-.1248
	Cd100	-.3028	.30010	.314	-.8933	.2877
	X2	-.4792	.30010	.111	-1.0697	.1114
X2	Control	-.2347	.30010	.435	-.8252	.3558
	Cd50	-.2361	.30010	.432	-.8266	.3544
	Cd100	.1764	.30010	.557	-.4141	.7669
	Cd200	.4792	.30010	.111	-.1114	1.0697

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.242.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Σε επίπεδο ποικιλίας, παρατηρείται πως η μείωση του ύψους δεν είναι ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης του καδμίου. Στα φυτά μάρτυρες, οι ποικιλίες που εμφάνισαν τις μεγαλύτερες τιμές για το γνώρισμα του ύψους ήταν η Romana Green Tower και η Romana, με ύψος 26,5 και 25,5 cm αντίστοιχα. Ακολούθησαν οι ποικιλίες Lattuga Grandi loghi-Brasiliana και Red Batavia, οι οποίες δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους, και η Romana Hot, με ύψος περί τα 24 και 22,5 cm,

αντίστοιχα. Τέλος, η ποικιλία Geo store Manchester εμφάνισε τις μικρότερες τιμές για το γνώρισμα του ύψους (περίπου 13 cm) (Πίνακας 3.15).

Ειδικότερα, κατά την τελευταία ημερομηνία παρατήρησης (16/07/2018), στις ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana και Red Batavia, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές στη φάση της βλάστησης, το ύψος δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την καταπόνηση Cd, σε όλα τα επίπεδα στρες, παρέχοντας ενδείξεις για ένα επίπεδο ανθεκτικότητας. Ωστόσο, στις ποικιλίες Romana και Romana Green Tower, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως μέτριας ανθεκτικότητας και ευαίσθητη αντίστοιχα, το ύψος επηρεάστηκε από το εφαρμοζόμενο επίπεδο καταπόνησης. Έτσι, η μείωση του ύψους υπήρξε ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης Cd, με τη μεγαλύτερη μείωση να σημειώνεται στην υψηλότερη συγκέντρωση (200 μM). Στη συγκέντρωση αυτή, καταγράφηκε μείωση του ύψους, κατά περίπου 2 cm, καταδεικνύοντας την αρνητική επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης Cd. Η ποικιλία Romana Hot εμφάνισε αυξημένο ύψος κατά περίπου 2 cm, συγκριτικά με τους μάρτυρες, στο χαμηλό και μεσαίο επίπεδο στρες, ενώ στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης το ύψος μειώθηκε περίπου κατά 2 cm. Τέλος, η ποικιλία Geo store Manchester δεν επηρεάστηκε δυσμενώς από την καταπόνηση Cd έως και στο μεσαίο επίπεδο στρες (100 μM), ενώ στο υψηλό επίπεδο έγινε εμφανής μια τάση μείωσης του ύψους. Συνοπτικά, παρατηρείται πως για το σύνολο των ποικιλιών, η μείωση δε διέφερε σημαντικά στα διαφορετικά επίπεδα μεταχείρισης, με αποτέλεσμα να μην καταστεί εφικτή η κατάταξη των ποικιλιών με βάση την ανθεκτικότητά τους. Συνεπώς, το γνώρισμα αυτό θεωρείται ότι δεν αποτελεί κριτήριο αξιολόγησης και επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων (Πίνακας 3.15) (Εικόνα 3.5).

Πίνακας 3.9: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ύψους μεταξύ των 6 διαφορετικών ποικιλιών.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Height

LSD

(I) Variety	(J) Variety	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	Red Batavia	.4600	.32874	.163	-.1869	1.1069
	Romana	-1.8383*	.32874	.000	-2.4852	-1.1915
	Geo store Manchester	5.2067*	.32874	.000	4.5598	5.8535

	Romana Green Tower	-2.8467*	.32874	.000	-3.4935	-2.1998
	Romana Hot	.6200	.32874	.060	-.0269	1.2669
Red Batavia	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-.4600	.32874	.163	-1.1069	.1869
	Romana	-2.2983*	.32874	.000	-2.9452	-1.6515
	Geo store Manchester	4.7467*	.32874	.000	4.0998	5.3935
	Romana Green Tower	-3.3067*	.32874	.000	-3.9535	-2.6598
	Romana Hot	.1600	.32874	.627	-.4869	.8069
Romana	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	1.8383*	.32874	.000	1.1915	2.4852
	Red Batavia	2.2983*	.32874	.000	1.6515	2.9452
	Geo store Manchester	7.0450*	.32874	.000	6.3981	7.6919
	Romana Green Tower	-1.0083*	.32874	.002	-1.6552	-.3615
	Romana Hot	2.4583*	.32874	.000	1.8115	3.1052
Geo store Manchester	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-5.2067*	.32874	.000	-5.8535	-4.5598
	Red Batavia	-4.7467*	.32874	.000	-5.3935	-4.0998
	Romana	-7.0450*	.32874	.000	-7.6919	-6.3981
	Romana Green Tower	-8.0533*	.32874	.000	-8.7002	-7.4065
	Romana Hot	-4.5867*	.32874	.000	-5.2335	-3.9398
Romana Green Tower	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	2.8467*	.32874	.000	2.1998	3.4935
	Red Batavia	3.3067*	.32874	.000	2.6598	3.9535
	Romana	1.0083*	.32874	.002	.3615	1.6552
	Geo store Manchester	8.0533*	.32874	.000	7.4065	8.7002
	Romana Hot	3.4667*	.32874	.000	2.8198	4.1135
Romana Hot	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-.6200	.32874	.060	-1.2669	.0269
	Red Batavia	-.1600	.32874	.627	-.8069	.4869
	Romana	-2.4583*	.32874	.000	-3.1052	-1.8115
	Geo store Manchester	4.5867*	.32874	.000	3.9398	5.2335
	Romana Green Tower	-3.4667*	.32874	.000	-4.1135	-2.8198

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.242.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

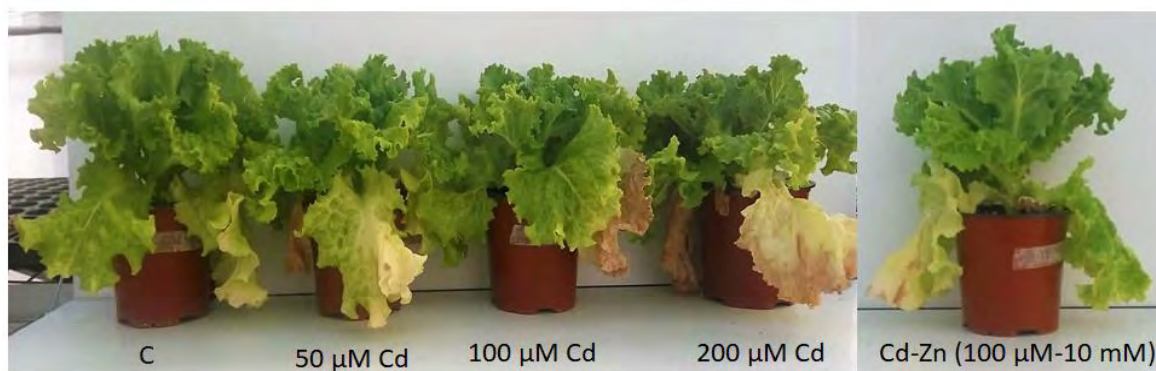
Αναφορικά με τη συνδυασμένη καταπόνηση καδμίου-ψευδαργύρου, φάνηκε να επηρεάζει θετικά το ύψος των ποικιλιών Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana και Red Batavia, οι οποίες

χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές στη φάση της βλάστησης. Στην επέμβαση αυτή, το ύψος των φυτών κυμάνθηκε σε επίπεδα ανάλογα με αυτά του χαμηλό επιπέδου στρες (50μM) (Γράφημα 3.9). Σε όλες τις υπόλοιπες ποικιλίες, η συνδυασμένη καταπόνηση δεν επηρέασε σημαντικά το ύψος των φυτών, με τις τιμές να κυμαίνονταν σε παρόμοια επίπεδα με το μεσαίο (Cd 100 μM) και υψηλό επίπεδο στρες (Cd 200 μM) (Εικόνα 3.5).

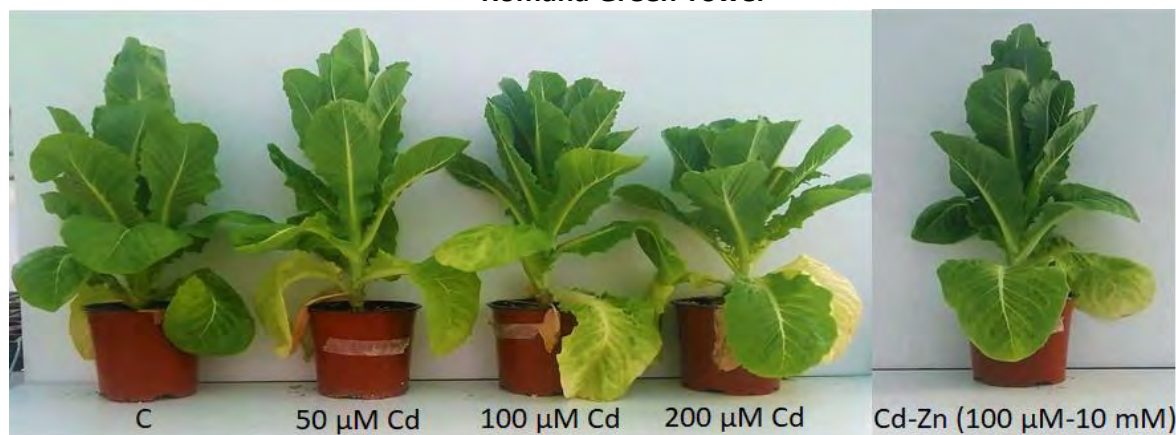
Latuga Grandhi Loghi Brasilliana



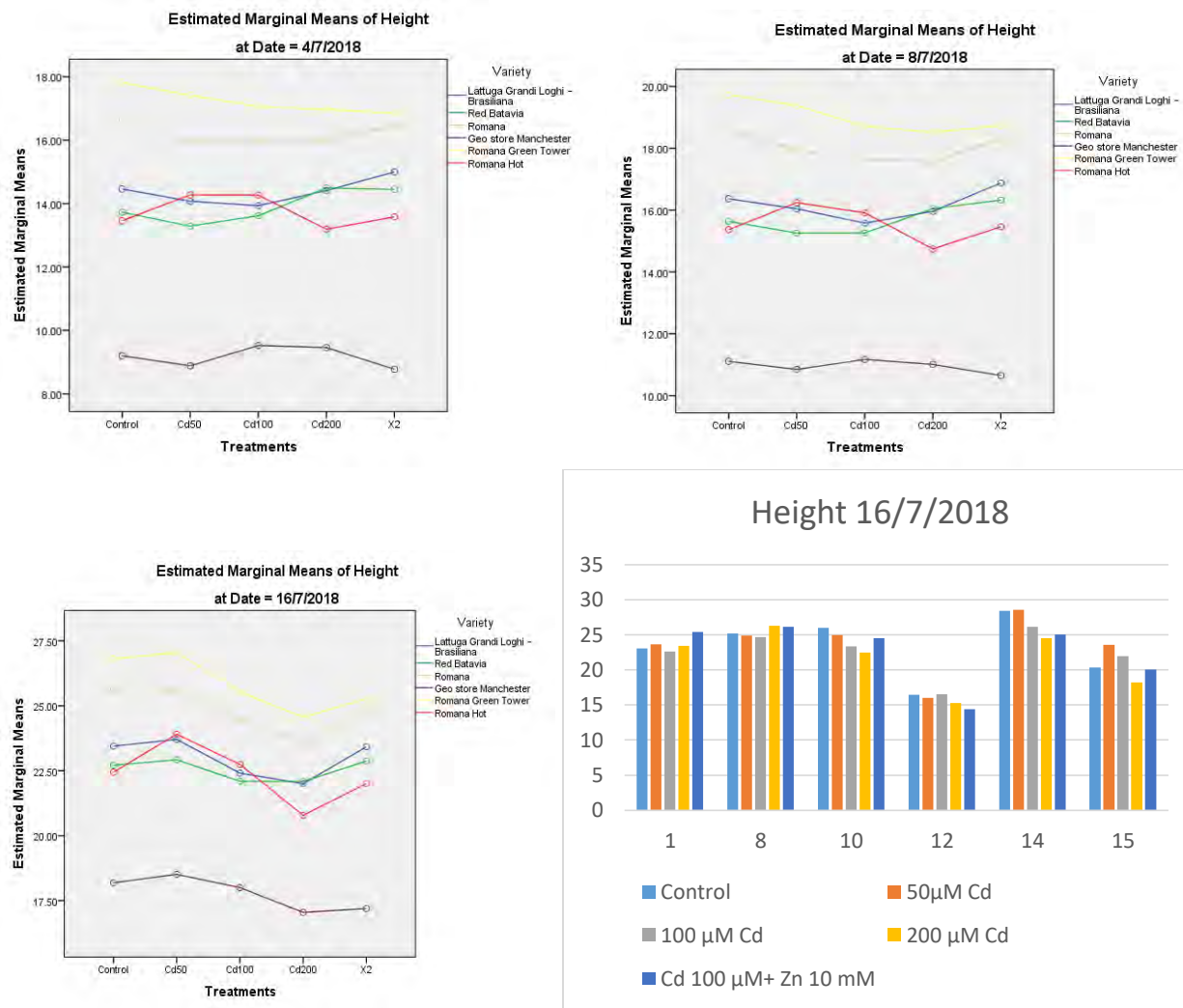
Geo store Manchester



Romana Green Tower



Εικόνα 3.5: Απεικόνιση 3 επιλεγμένων ποικιλιών που κατηγοριοποιήθηκαν ως ανθεκτικές (Lattuga Grandi Loghi Brasilliana), μέτριας ανθεκτικότητας (Geo stor Manchester) και ευαίσθητες (Romana Green Tower) στα υπό μελέτη επίπεδα καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)) κατά την τελευταία ημερομηνία παρατήρησης (16/07/2018).



Γράφημα 3.9: Ύψος φυτών μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) (07/08/2018) σε 3 διαφορετικές ημερομηνίες.

3.2.4 Επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα στη χλωροφύλλη των φυτών μαρουλιού

A. Προσδιορισμός χλωροφύλλης με τη χρήση χλωροφυλλόμετρου (SPAD)

Αναφορικά με την περιεχόμενη χλωροφύλλη, τα ευρήματα της ανάλυσης υπογραμμίζουν τη σημαντικότητα του παράγοντα ποικιλία της αλληλεπίδρασης ποικιλίας-επέμβασης, αλλά όχι του παράγοντα επέμβαση, που σχετίζεται με τα διαφορετικά εφαρμοζόμενα επίπεδα καταπόνησης από

βαρέα μέταλλα (Πίνακας 3.16). Παράλληλα, τα αποτελέσματα της ανάλυσης (t-test) σχετικά με την επίδραση της διάρκειας καταπόνησης στο ποσοστό περιεχόμενης χλωροφύλλης, υποδεικνύουν την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των δύο ημερομηνιών λήψης παρατηρήσεων.

Πίνακας 3.10: Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της επίδρασης καταπόνησης καδμίου και συνδυασμένης καταπόνησης καδμίου-ψευδαργύρου στο ποσοστό χλωροφύλλης φυτών μαρουλιού σε 6 διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Spad

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	198318.170	1	.	.	.
	Error	.	a	.	.	.
Variety	Hypothesis	4509.922	5	901.984	65.740	.000
	Error	2606.891	190	13.720 ^b		
Treatments	Hypothesis	189.965	4	47.491	2.067	.250
	Error	91.686	3.991	22.971 ^c		
Date	Hypothesis	2.773	1	2.773	.128	.739
	Error	86.695	4	21.674 ^d		
Rep	Hypothesis	17.659	3	5.886	.387	.764
	Error	182.455	12	15.205 ^e		
Treatments * Rep	Hypothesis	182.455	12	15.205	1.108	.356
	Error	2606.891	190	13.720 ^b		
Variety * Treatments	Hypothesis	522.595	20	26.130	1.904	.014
	Error	2606.891	190	13.720 ^b		
Treatments * Date	Hypothesis	86.695	4	21.674	1.580	.181
	Error	2606.891	190	13.720 ^b		

a. Cannot compute the error degrees of freedom using Satterthwaite's method.

b. MS(Error)

c. .999 MS(Treatments * Rep) + .977 MS(Treatments * Date) - .976 MS(Error)

d. MS(Treatments * Date)

e. MS(Treatments * Rep)

Όσον αφορά τους μάρτυρες, οι ποικιλίες που εμφάνισαν τις μεγαλύτερες τιμές χλωροφύλλης είναι η Red Batavia και η Romana Green Tower (περίπου 35 %). Κατά φθίνουσα σειρά οι διαφορετικοί γονότυποι κατατάσσονται ως προς τις τιμές χλωροφύλλης ως εξής: Red Batavia > Romana Green Tower > Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana > Romana > Romana Hot > Geo store Manchester.

Αντίστοιχα στα καταπονημένα φυτά, οι ποικιλίες που χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές στη φάση της βλάστησης, διέφεραν ως προς το προφίλ απόκρισής τους στην καταπόνηση αναφορικά με το ποσοστό περιεχόμενης χλωροφύλλης. Κατά την 1^η ημερομηνία παρατήρησης (10/07/2018), η ποικιλία Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana, εμφάνισε μια τάση αύξησης της χλωροφύλλης ανάλογη με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης. Αντίθετα, η ποικιλία Red Batavia επέδειξε τάση μείωσης της χλωροφύλλης με την αύξηση του επιπέδου καταπόνησης, με εξαίρεση το υψηλό επίπεδο στρες Cd (200 μM), όπου σημειώθηκε αύξηση της μεταβλητής. Κατά την 2^η ημερομηνία παρατήρησης (23/07/2018), η περιεχόμενη χλωροφύλλη δεν επηρεάστηκε από το εφαρμοζόμενο επίπεδο στρες και στις δύο ποικιλίες, καθώς στη Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana το ποσοστό χλωροφύλλης αυξήθηκε σε όλα τα επίπεδα στρες ενώ στη Red Batavia η χλωροφύλλη παρέμεινε σε επίπεδα ανάλογα με αυτά του μάρτυρα (Γράφημα 3.10). Οι δύο ποικιλίες δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ως προς τη μεταβλητή αυτή, υποδεικνύοντας ένα επίπεδο ανθεκτικότητας έναντι της τοξικότητας Cd (Πίνακας 3.17).

Πίνακας 3.11: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ποσοστού χλωροφύλλης μεταξύ των 6 διαφορετικών ποικιλιών

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Spad

LSD

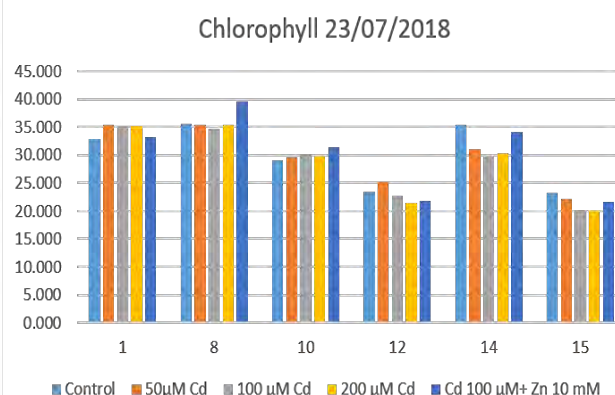
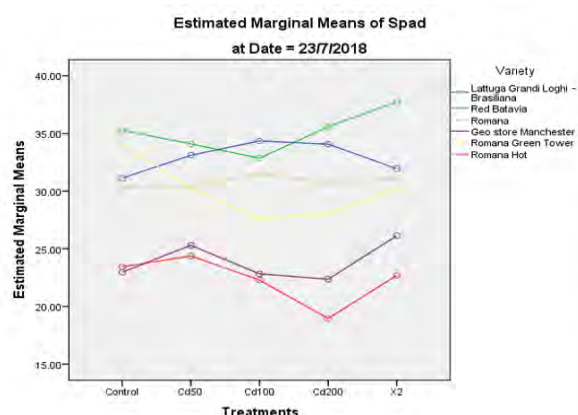
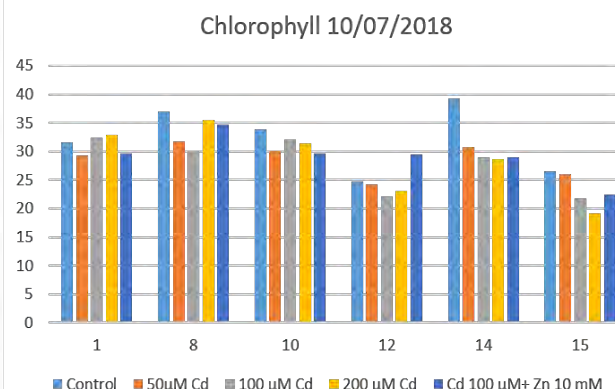
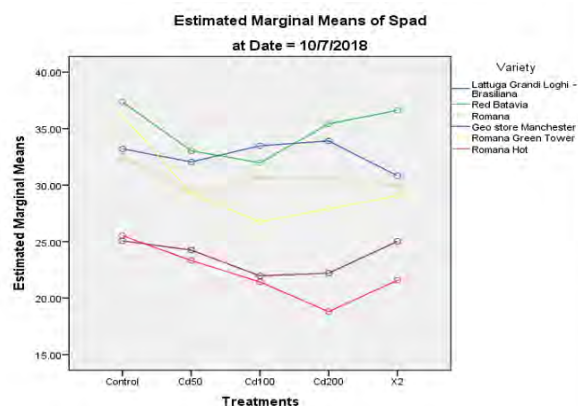
(I) Variety	(J) Variety	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	Red Batavia	-2.1875*	.79292	.006	-3.7531	-.6219
	Romana	2.0825*	.79292	.009	.5169	3.6481
	Geo store Manchester	8.9925*	.79292	.000	7.4269	10.5581
	Romana Green Tower	2.9050*	.75223	.000	1.4198	4.3902
	Romana Hot	10.4950*	.85645	.000	8.8040	12.1860

Red Batavia	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	2.1875*	.79292	.006	.6219	3.7531
	Romana	4.2700*	.79292	.000	2.7044	5.8356
	Geo store Manchester	11.1800*	.79292	.000	9.6144	12.7456
	Romana Green Tower	5.0925*	.75223	.000	3.6073	6.5777
	Romana Hot	12.6825*	.85645	.000	10.9915	14.3735
Romana	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-2.0825*	.79292	.009	-3.6481	-.5169
	Red Batavia	-4.2700*	.79292	.000	-5.8356	-2.7044
	Geo store Manchester	6.9100*	.79292	.000	5.3444	8.4756
	Romana Green Tower	.8225	.75223	.276	-.6627	2.3077
	Romana Hot	8.4125*	.85645	.000	6.7215	10.1035
Geo store Manchester	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-8.9925*	.79292	.000	-10.5581	-7.4269
	Red Batavia	-11.1800*	.79292	.000	-12.7456	-9.6144
	Romana	-6.9100*	.79292	.000	-8.4756	-5.3444
	Romana Green Tower	-6.0875*	.75223	.000	-7.5727	-4.6023
	Romana Hot	1.5025	.85645	.081	-.1885	3.1935
Romana Green Tower	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-2.9050*	.75223	.000	-4.3902	-1.4198
	Red Batavia	-5.0925*	.75223	.000	-6.5777	-3.6073
	Romana	-.8225	.75223	.276	-2.3077	.6627
	Geo store Manchester	6.0875*	.75223	.000	4.6023	7.5727
	Romana Hot	7.5900*	.81893	.000	5.9731	9.2069
Romana Hot	Lattuga Grandi Loghi – Brasiliana	-10.4950*	.85645	.000	-12.1860	-8.8040
	Red Batavia	-12.6825*	.85645	.000	-14.3735	-10.9915
	Romana	-8.4125*	.85645	.000	-10.1035	-6.7215
	Geo store Manchester	-1.5025	.85645	.081	-3.1935	.1885
	Romana Green Tower	-7.5900*	.81893	.000	-9.2069	-5.9731

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 12.575.

*, The mean difference is significant at the .05 level.



Γράφημα 3.10: Ποσοστό χλωροφύλλης φυτών μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)) σε 2 διαφορετικές ημερομηνίες.

Όσον αφορά τους γονότυπους που χαρακτηρίστηκαν ως μέτριας ανθεκτικότητας στη φάση της βλάστησης, κατά την 1^η ημερομηνία παρατήρησης (10/07/2018), το ποσοστό χλωροφύλλης επηρεάστηκε δυσμενώς και στις 2 ποικιλίες, με τη Romana να εμφανίζει τη μεγαλύτερη μείωση, συγκριτικά με τους μάρτυρες, στο χαμηλό και τη Geo store Manchester στο μεσαίο επίπεδο στρες Cd. Αντίθετα κατά τη 2^η ημερομηνία παρατήρησης (23/07/2018), στην ποικιλία Romana, η χλωροφύλλη παρέμεινε σταθερή σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης, ενώ παράλληλα δε διέφερε σημαντικά από τον ανθεκτικό γονότυπο Lattuga Grandi Loghi-Brasilliana, παρέχοντας ενδείξεις για ένα ορισμένο επίπεδο ανθεκτικότητας. Στην Geo store Manchester, το ποσοστό χλωροφύλλης αυξήθηκε, συγκριτικά με το μάρτυρα, στο χαμηλό επίπεδο στρες, ενώ εμφάνισε πτώση στα υψηλότερα επίπεδα στρες εμφανίζοντας ένα είδος ευαισθησίας στην τοξικότητα. Στα επίπεδα

αυτά, οι τιμές της ποικιλίας αυτής δε διέφεραν σημαντικά από τις αντίστοιχες τιμές της ευαίσθητης ποικιλίας Romana Hot (Πίνακες 3.17 και 3.18).

Στις ποικιλίες που χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στη φάση της βλάστησης, η αρνητική επίδραση της τοξικότητας υπήρξε εμφανής και στις 2 ημερομηνίες παρατήρησης. Στις ποικιλίες αυτές, τα υψηλά επίπεδα στρες (100 και 200 μM) επέφεραν αισθητή μείωση της χλωροφύλλης, με τη Romana Green Tower να εμφανίζει τη μεγαλύτερη μείωση στο μεσαίο (100 μM) και τη Romana Hot στο υψηλό επίπεδο στρες Cd (200 μM) (Πίνακες 3.17 και 3.18).

Πίνακας 3.12: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ποσοστού χλωροφύλλης μεταξύ των διαφορετικών ημερομηνιών παρατήρησης

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Spad	2.863	.092	-	238	.777	-.21500	.75806	-	1.27837
			.284					1.70837	
Equal variances assumed	2.863	.092	-	238	.777	-.21500	.75806	-	1.27837
			.284					1.70837	
Equal variances not assumed	2.863	.092	-	237.271	.777	-.21500	.75806	-	1.27840
			.284					1.70840	

Αντίθετα, η συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn, επέδρασε θετικά αποτελέσματα στην ποσότητα χλωροφύλλης, καθώς σημειώθηκαν παρόμοιες ή ακόμη και υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τους μάρτυρες για το σύνολο σχεδόν των εξεταζόμενων ποικιλιών. Συγκεκριμένα, στις ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi-Brasilliana και Romana, ο συνδυασμός Cd-Zn οδήγησε στη διαμόρφωση όμοιας τιμής με την αντίστοιχη στο χαμηλό επίπεδο στρες Cd. Τέλος, στη Red Batavia ο συνδυασμός Cd-Zn οδήγησε σε τιμές χλωροφύλλης υψηλότερες από αυτές του χαμηλού επιπέδου

στρες Cd, ενώ στη Geo store Manchester σημειώθηκε τιμή που ξεπέρασε αυτή των μαρτύρων (Πίνακας 3.19).

Πίνακας 3.13: Αξιολόγηση της διαφοροποίησης του ποσοστού χλωροφύλλης μεταξύ των επεμβάσεων καταπόνησης από βαρέα μέταλλα (Cd: 50, 100 και 200 μ M, X2: Cd (100 μ M) – Zn (10 mM)).

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Spad

LSD

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Cd50	1.7271*	.72384	.018	.2979	3.1563
	Cd100	2.6854*	.72384	.000	1.2562	4.1146
	Cd200	2.4521*	.72384	.001	1.0229	3.8813
	X2	1.3312	.72384	.068	-.0979	2.7604
Cd50	Control	-1.7271*	.72384	.018	-3.1563	-.2979
	Cd100	.9583	.72384	.187	-.4708	2.3875
	Cd200	.7250	.72384	.318	-.7042	2.1542
	X2	-.3958	.72384	.585	-1.8250	1.0333
Cd100	Control	-2.6854*	.72384	.000	-4.1146	-1.2562
	Cd50	-.9583	.72384	.187	-2.3875	.4708
	Cd200	-.2333	.72384	.748	-1.6625	1.1958
	X2	-1.3542	.72384	.063	-2.7833	.0750
Cd200	Control	-2.4521*	.72384	.001	-3.8813	-1.0229
	Cd50	-.7250	.72384	.318	-2.1542	.7042
	Cd100	.2333	.72384	.748	-1.1958	1.6625
	X2	-1.1208	.72384	.123	-2.5500	.3083
X2	Control	-1.3312	.72384	.068	-2.7604	.0979
	Cd50	.3958	.72384	.585	-1.0333	1.8250
	Cd100	1.3542	.72384	.063	-.0750	2.7833
	Cd200	1.1208	.72384	.123	-.3083	2.5500

Based on observed means.

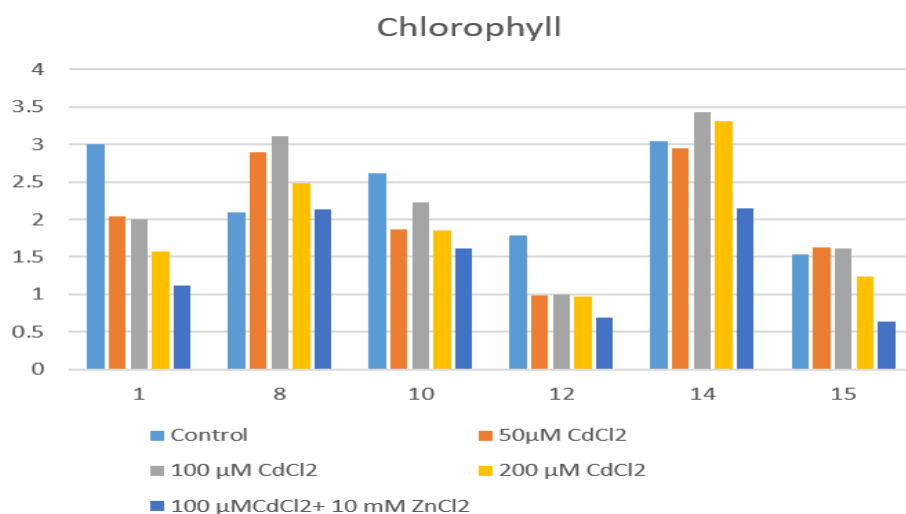
The error term is Mean Square(Error) = 12.575.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

B. Προσδιορισμός χλωροφύλλης με εκχύλιση από φυλλικούς δίσκους

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης υποδεικνύουν ότι η χλωροφύλλη επηρεάστηκε σημαντικά από το εφαρμοζόμενο επίπεδο καταπόνησης από βαρέα μέταλλα. Ωστόσο, το προφίλ απόκρισης των ποικιλιών, αναφορικά με την περιεχόμενη χλωροφύλλη, διαφοροποιήθηκε σημαντικά, με ορισμένες ποικιλίες να παρουσιάζουν μείωση και άλλες αύξηση της χλωροφύλλης έπειτα από έκθεση στα βαρέα μέταλλα.

Ως προς τα φυτά μάρτυρες, οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi-Brasilliana και Romana Green Tower εμφάνισαν τη μεγαλύτερη τιμή χλωροφύλλης, περί τα 3 $\mu\text{g/ml}$. Οι γονότυποι που ακολούθησαν ήταν η Romana, σημειώνοντας τιμή 2,5 $\mu\text{g/ml}$, και οι Red Batavia και Geo store Manchester, με τιμή της τάξης των 2 $\mu\text{g/ml}$. Τέλος, η ποικιλία Romana Hot εμφάνισε τη χαμηλότερη τιμή (1,5 $\mu\text{g/ml}$) (Γράφημα 3.11).



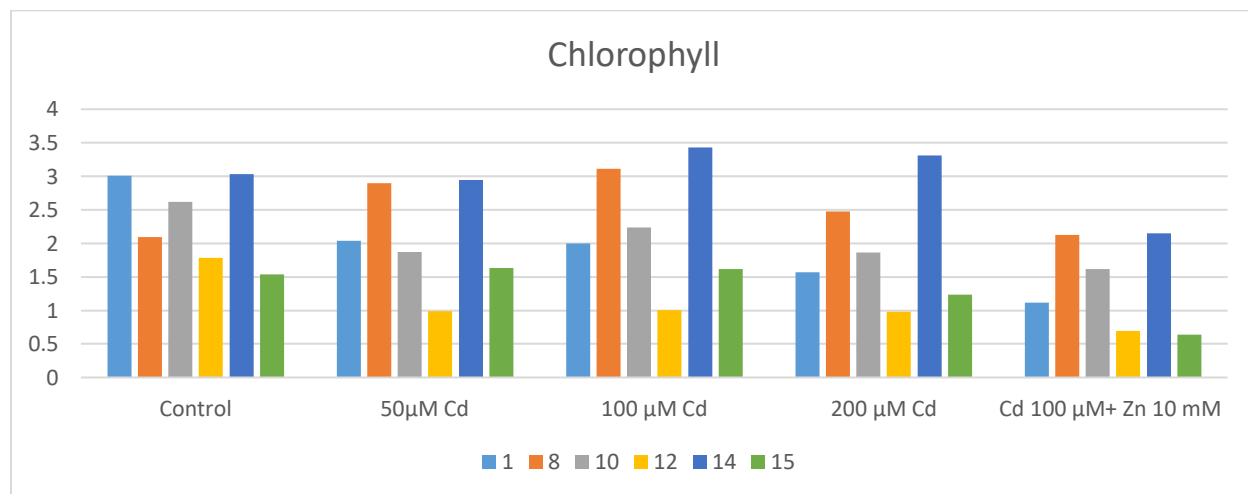
Γράφημα 3.11: Ποσοστό χλωροφύλλης φυτών μαρουλιού ανά ποικιλία και επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)).

Αναφορικά με τους γονότυπους που επιλέχθηκαν για την ανοχή τους στη καταπόνηση στη φάση της βλάστησης, η Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana εμφάνισε τάση μείωσης της χλωροφύλλης ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης καδμίου ενώ αντίθετα, η Red Batavia εμφάνισε τάση αύξησης της χλωροφύλλης, συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Συγκεκριμένα, η Lattuga Grandi Loghi-Brasiliana εμφάνισε μείωση της χλωροφύλλης, κατά περίπου 1 $\mu\text{g/ml}$ και 1,5 $\mu\text{g/ml}$, στο χαμηλό (Cd: 50 μM) και υψηλό επίπεδο στρες (Cd: 200 μM) αντίστοιχα. Στη Red Batavia, η

περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη σημείωσε αυξητική τάση, έως και 1 $\mu\text{g/ml}$ περισσότερο, σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Στους γονότυπους που χαρακτηρίστηκαν ως μέτριας ανθεκτικότητας στη φάση της βλάστησης, παρατηρήθηκε τάση μείωσης της χλωροφύλλης με την αύξηση της συγκέντρωσης Cd. Και στις δύο ποικιλίες, η μεγαλύτερη μείωση της χλωροφύλλης (περίπου 1 $\mu\text{g/ml}$), καταγράφηκε στο μεσαίο και υψηλό επίπεδο στρες. Όσον αφορά τους ευαίσθητους γονότυπους, η ποικιλία Romana Green Tower παρουσίασε αύξηση της χλωροφύλλης στο μεσαίο και υψηλό επίπεδο στρες, ενώ στη Romana Hot η περιεκτικότητα χλωροφύλλης παρέμεινε σταθερή στο χαμηλό και μεσαίο επίπεδο στρες και αυξήθηκε, συγκριτικά με τους μάρτυρες, στο υψηλό επίπεδο στρες.

Αναφορικά με τη σύγκριση των τιμών χλωροφύλλης στα υπό μελέτη επίπεδα καταπόνησης, οι μικρότερες τιμές χλωροφύλλης σημειώθηκαν στη συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn, ενώ αντίθετα η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σημειώθηκε στο μεσαίο επίπεδο στρες (Γράφημα 3.12).



Γράφημα 3.12: Περιεκτικότητα χλωροφύλλης ανά επίπεδο καταπόνησης (Cd: 50, 100 και 200 μM , X2: Cd (100 μM) – Zn (10 mM)) και ανά ποικιλία.

4. Συζήτηση

Τις τελευταίες δεκαετίες, ο επιταχυνόμενος ρυθμός εκβιομηχάνισης, σε συνδυασμό με την αστικοποίηση και την εντατικοποίηση της γεωργίας, έχουν εντείνει σημαντικά την περιβαλλοντική χημική ρύπανση. Μεταξύ των διάφορων περιβαλλοντικών ρύπων, τα βαρέα μέταλλα κατέχουν κυρίαρχη θέση καθώς αποτελούν έναν από τους πιο επικίνδυνους ρύπους τόσο για το περιβάλλον όσο και για την υγεία των ανθρώπων-καταναλωτών καθώς αποβαίνουν τοξικά, όταν η συσσώρευσή τους ξεπεράσει κάποια όρια, συνήθως χαμηλά. Παράλληλα, η επικινδυνότητά τους έγκειται στο γεγονός ότι τα βαρέα μέταλλα δεν αποδομούνται αλλά συσσωρεύονται στο έδαφος και στον υδροφόρο ορίζοντα, όπου μένουν ενεργά επί σειρά ετών, και εν συνεχεία αφομοιώνονται από καλλιεργούμενα είδη-συσσωρευτές και εισέρχονται σε οργανισμούς-καταναλωτές διαμέσου της τροφικής αλυσίδας. Σε αυτό το πλαίσιο, πληθώρα ερευνών καταδεικνύει τη συσσώρευση τοξικών μετάλλων σε ποικίλα φυτικά είδη που καλλιεργούνται σε βιομηχανικές περιοχές.

Σύμφωνα με τους Achakzai et al. (2011), τα φυλλώδη λαχανικά θεωρούνται υπερασσωρευτές βαρέων μετάλλων. Ειδικότερα, έρευνες που αφορούν στη συσσώρευση βαρέων μετάλλων σε φυτικά είδη υπογραμμίζουν το γεγονός ότι τα φυλλώδη λαχανικά έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν τεράστιες ποσότητες τοξικών μετάλλων συγκριτικά με άλλες κατηγορίες λαχανικών (Zhou et al., 2016). Μεταξύ των λαχανευόμενων κηπευτικών, το μαρούλι χαρακτηρίζεται ως υπερασσωρευτής βαρέων μετάλλων (Pereira et al., 2011) ενώ παράλληλα, είναι αξιοσημείωτο ότι οι μεγαλύτερες ποσότητες συσσωρεύονται στα φύλλα και στους βλαστούς (έως και 77 %) και μικρότερες στις ρίζες (23 %) (Bautista et al., 2013), γεγονός που συνεπάγεται την εναπόθεση σημαντικών ποσοτήτων τοξικών μετάλλων στα βρώσιμα μέρη του φυτού. Με δεδομένο ότι τα βαρέα μέταλλα εμφανίζουν αθροιστική δράση στους οργανισμούς-καταναλωτές και ότι το μαρούλι κατέχει κυρίαρχη θέση στην προτίμηση και τις διατροφικές συνήθειες του καταναλωτικού κοινού, εγείρονται σοβαροί κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία. Για τους λόγους αυτούς, τα τελευταία χρόνια πληθώρα μελετών έχει εστιάσει στη διερεύνηση της δυνατότητας συσσώρευσης βαρέων μετάλλων στα βρώσιμα μέρη των κηπευτικών με στόχο την εξασφάλιση της υγείας του καταναλωτή.

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης γονοτύπων μαρουλιού ως προς την ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα, και συγκεκριμένα σε περίσσεια καδμίου και ψευδαργύρου. Δεδομένου ότι η αποτελεσματικότητα των σχετικών διαδικασιών αξιολόγησης γενετικού υλικού έγκειται στην αξιόπιστη διάκριση της ανθεκτικότητας και ευαισθησίας, παράλληλο στόχο αποτέλεσε ο προσδιορισμός κατάλληλων μεθόδων επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Για την επίτευξη των στόχων που έχουν τεθεί, οι υπό μελέτη γονότυποι αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα σε περίσσεια βαρέων μετάλλων α) στη φάση της βλάστησης και β) σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια και ακολούθησε η εκτίμηση της συσχέτισης της ανθεκτικότητας κατά τα στάδια αυτά ώστε να διαπιστωθεί η αξιοπιστία της πρώιμης επιλογής επιθυμητών γονοτύπων.

Προς την κατεύθυνση αυτή, αρχικά έγινε *in vitro* αξιολόγηση του δυναμικού βλάστησης και ανάπτυξης 14 εμπορικών ποικιλιών μαρουλιού, που ανήκουν στις 4 κύριες βοτανικές ομάδες, ενώ η αξιολόγηση βασίστηκε στο ποσοστό βλάστησης, στο μήκος ρίζας και βλαστού και στον αριθμό σπορόφυτων με μη φυσιολογικό φαινότυπο. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι τα βαρέα μέταλλα και ειδικά το κάδμιο, καθώς και η συνδυασμένη καταπόνηση καδμίου-ψευδαργύρου, επηρέασαν σημαντικά την ανάπτυξη των υπό μελέτη ποικιλιών μαρουλιού. Παρά το γεγονός ότι το ποσοστό βλάστησης υπό συνθήκες καταπόνησης γενικά θεωρείται αξιόπιστο κριτήριο γονοτυπικής αξιολόγησης, καθώς παρέχει ικανοποιητικές ενδείξεις για το δυναμικό ανάπτυξης και απόδοσης και την επιτυχή εγκατάσταση της καλλιέργειας, τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι επεμβάσεις καταπόνησης δεν επηρέασαν σημαντικά το ποσοστό βλάστησης των σπόρων. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι τα αυξανόμενα επίπεδα καταπόνησης με κάδμιο δεν επηρέασαν αρνητικά το ποσοστό βλάστησης, καθώς από τα αρχικά στάδια της καταπόνησης σημειώθηκε ίδιο ποσοστό βλάστησης σε όλα τα επίπεδα στρες Cd, συμπεριλαμβανομένου και του υψηλού (200 μM Cd), συγκριτικά με τους μάρτυρες. Αντίθετα, η συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn επέφερε ορατή αναστολή βλάστησης στην πλειονότητα των ποικιλιών, η οποία ωστόσο αμβλύνθηκε με την πάροδο του χρόνου ώστε τελικά να επιτευχθούν παρόμοια ποσοστά βλάστησης με τους μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντιπαράθεση με ευρήματα άλλων ερευνών που συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι το δυναμικό βλάστησης υπό συνθήκες καταπόνησης από βαρέα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένου του Cd, είναι αντιστρόφως ανάλογο του εφαρμοζόμενου επιπέδου καταπόνησης. Έτσι, πρόσφατες έρευνες καταδεικνύουν την αρνητική επίδραση των βαρέων μετάλλων στο ποσοστό βλάστησης σε ποικίλα καλλιεργούμενα είδη, όπως

Leucaena leucocephala (Shafiq et al., 2008), σιτάρι (Ahmad et al., 2012) μαρούλι και σπανάκι (Bautista et al., 2013). Συγκεκριμένα, αναφέρεται η ανασταλτική δράση των βαρέων μετάλλων, όπως του καδμίου, μόλυβδου και χρωμίου, στη βλάστηση των σπόρων, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Ωστόσο, ιδιαίτερα σημαντική ήταν η επίδραση της τοξικότητας των μετάλλων στην ανάπτυξη των νεαρών σποροφύτων. Πιο συγκεκριμένα, το μήκος ρίζας και βλαστού εμφάνισαν μία τάση μείωσης, συγκριτικά με τους μάρτυρες, που υπήρξε ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης καδμίου. Η παρατηρηθείσα αναστολή ανάπτυξης της ρίζας και βλαστού καθόλη τη διάρκεια της καταπόνησης ήταν ιδιαίτερα εμφανής στο υψηλό επίπεδο στρες Cd (200 μ M), όπου τόσο η ρίζα όσο και ο βλαστός των σποροφύτων δεν ξεπέρασαν την τιμή των 0.5 cm στην πλειονότητα των ποικιλιών. Σε αυτό το στάδιο, διακρίθηκαν για την ανθεκτικότητά τους, οι ποικιλίες Lattuga Grandi Loghi Brasilliana και Red Batavia, καθώς υπερείχαν ως προς την ανάπτυξη ρίζας και βλαστού, εμφανίζοντας ικανοποιητικό μήκος (>1 cm) ακόμη και στο υψηλό επίπεδο στρες. Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με αναφορές σχετικών ερευνών τόσο σε φυτά μαρουλιού και σπανακιού (Bautista et al., 2013) όσο και σε άλλα είδη, όπως το *Albizia lebbbeck*, όπου η αυξανόμενη συγκέντρωση Cd και Pb επέφερε ανάλογη μείωση του μήκους ρίζας και αναστολή ανάπτυξης (Farooqi et al., 2009). Αντίστοιχα ευρήματα αναφέρονται για το σιτάρι, όπου παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του μήκους ρίζας και βλαστού έπειτα από καταπόνηση με Cd (Ahmad et al., 2012), αλλά και για τη τομάτα, όπου η έκθεση των φυτών σε Cd σε υδροπονικό σύστημα προκάλεσε μείωση της διαμέτρου της ρίζας, των πλευρικών ριζών και του βλαστού και αναστολή ανάπτυξης κατά περίπου 40 % (Alves et al., 2017). Παράλληλα, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αποχρωματισμός και καφέτιασμα της ρίζας στο υψηλό επίπεδο στρες Cd (200 μ M), γεγονός που ενισχύει τα ευρήματα πρόσφατων ερευνών όπου και σε χαμηλά επίπεδα καταπόνησης από Cd αναφέρεται αποχρωματισμός και καφέτιασμα ρίζας σε φυτά τομάτας (Cherif et al., 2010) και μαρουλιού (Monteiro et al., 2009).

Τα συνολικά αποτελέσματα από την *in vitro* αξιολόγηση των 14 εμπορικών ποικιλιών μαρουλιού παρείχαν τη δυνατότητα διάκρισης των φαινοτύπων ανθεκτικότητας και ευαισθησίας στη φάση της βλάστησης και επιπλέον, επέτρεψαν την κατηγοριοποίηση των ποικιλιών σε ανθεκτικές, μέτριας ανθεκτικότητας και ευαίσθητες σε βαρέα μέταλλα. Βάσει της κατηγοριοποίησης αυτής, επιλέχθηκαν 6 γονότυποι -2 από κάθε κατηγορία- προκειμένου να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητά

ή ευαισθησία τους σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι ποικιλίες i) Lattuga Grandi Loghi Brasilliana και Red Batavia, ως ανθεκτικές, ii) Romana και Geo store Manchester ως μέτριας ανθεκτικότητας και iii) Romana Green Tower και Romana Hot ως ευαίσθητες. Στο πλαίσιο αξιολόγησης της ανθεκτικότητας σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, υγιή φυτά υποβλήθηκαν σε καταπόνηση βαρέων μετάλλων με πότισμα με διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων CdCl_2 και $\text{CdCl}_2 / \text{ZnCl}_2$. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου, ενώ η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έγινε βάσει της ανάπτυξης συμπτωμάτων καταπόνησης, του ύψους των φυτών, του νωπού και ξηρού βάρους των φυτών και του ποσοστού περιεχόμενης χλωροφύλλης, με τη χρήση χλωροφυλλόμετρου SPAD και με εκχύλιση φυλλικών δίσκων σε αιθανόλη. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση υπογραμμίζουν τη σημαντική επίδραση της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα κατά τα στάδια αυτά.

Ως προς τις μεταβλητές του χλωρού και ξηρού βάρους, φαίνεται πως επηρεάστηκαν σημαντικά από την ποικιλία, την επέμβαση καταπόνησης αλλά και από την αλληλεπίδραση ποικιλίας-επέμβασης. Συγκεκριμένα, τόσο το χλωρό όσο και το ξηρό βάρος εμφάνισαν μείωση που υπήρξε ανάλογη με την αύξηση του επιπέδου στρες, με τη μείωση να παρουσιάζει μεγιστοποίηση στο υψηλό επίπεδο στρες Cd (200 μM). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα σχετικών ερευνών σε ρύζι και μαρούλι, όπου αναφέρεται μείωση του ξηρού βάρους ανάλογη με την αυξανόμενη συγκέντρωση Cd (Pereira et al., 2011). Παρόμοια αποτελέσματα μείωσης του ξηρού βάρους λήφθηκαν επίσης έπειτα από καταπόνηση με Cd φυτών μαρουλιού, γογγυλιού, ρεπανιού, καλαμποκιού, κριθαριού και μηδικής αλλά και σε φυτά του είδους *A. lebbeck* (Lagiffoul et al., 1998; Benzarti et al., 2008; Farooqi et al., 2009; Akhter et al., 2012; Hassanein et al., 2013), μείωση η οποία, σύμφωνα με τους Yang et al. (1996), αποδίδεται στην τοξικότητα των βαρέων μετάλλων και ειδικότερα του Cd. Στην παρούσα μελέτη, οι ποικιλίες που εμφάνισαν τη μικρότερη μείωση χλωρού και ξηρού βάρους, συγκριτικά με τους μάρτυρες, ήταν οι Lattuga Grandi-Loghi Brasilliana και Red Batavia ακολουθούμενες από τις Romana και Geo store Manchester, με τις δύο πρώτες να εμφανίζουν τις μικρότερες απώλειες σε όλες τις επεμβάσεις καταπόνησης, επιδεικνύοντας ένα επίπεδο ανθεκτικότητας.

Αναφορικά με το ύψος των φυτών, η ανάλυση κατέδειξε απουσία στατιστικά σημαντικών τόσο σε επίπεδο ποικιλίας όσο και σε επίπεδο επέμβασης. Ειδικότερα, το ύψος των φυτών δε διέφερε, συγκριτικά με τους μάρτυρες, σε κανένα από τα υπό μελέτη επίπεδα καταπόνησης, ενώ ακόμη και

στο υψηλό επίπεδο στρες σημειώθηκε μείωση του ύψους η οποία ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αναφορικά με το φαινότυπο των καταπονημένων φυτών, είναι αξιοσημείωτο ότι τα φυτά αναπτύχθηκαν απουσία συμπτωμάτων καταπόνησης όπως χλωρώσεις φύλλων, νεκρωτικές ή άλλου τύπου κηλίδες, συστροφές φύλλων και γενικότερη όψη μαλασμού. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα σχετικών μελετών σε φυτά ρυζιού και μαρουλιού, όπου δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά ορατά συμπτώματα παρά μόνο ελαφρά χλώρωση και πτώση παλαιότερων φύλλων (Monterio et al., 2009; Pereira et al., 2011). Αντίθετα, η καταπόνηση καδμίου σε φυτά τομάτας (Cherif et al., 2010), κριθαριού και μαρουλιού (Akhter et al., 2012), οδήγησε ανάπτυξη συμπτωμάτων χλώρωσης φύλλων και νεκρωτικών κηλίδων. Η παρατηρηθείσα ανεκτικότητα, ως προς την εκδήλωση συμπτωμάτων καταπόνησης, καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική, εάν ληφθεί υπόψη η αδυναμία ανίχνευσης της τοξικότητας από βαρέα μέταλλα και αναγνώρισης των φυτών που πιθανώς έχουν συσσωρεύσει μεγάλες ποσότητες τοξικών μετάλλων.

Ως προς την περιεκτικότητα των φυτών σε χλωροφύλλη, αυτή επηρεάστηκε σημαντικά από την ποικιλία καθώς και την αλληλεπίδραση ποικιλίας-επέμβασης καταπόνησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν έπειτα από μέτρηση με χλωροφυλλόμετρο (SPAD), σημειώθηκε μια τάση μείωσης της χλωροφύλλης που υπήρξε ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης Cd στην πλειονότητα των ποικιλιών. Η παρατηρηθείσα μείωση της χλωροφύλλης βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα ερευνών σε 3 διαφορετικά είδη αγρωστωδών (Ewais., 1997) καθώς και σε φυτά του είδους *Sinapis alba* (Fargašová, 2001), η χλωροφύλλη Chla και Chlb μειώθηκε αναλογικά με την εφαρμοζόμενη καταπόνηση Cd. Παράλληλα, πρόσφατες έρευνες σε φυτά του είδους *Phaseolus vulgaris* καταδεικνύουν ότι η καταπόνηση Cd επιφέρει μείωση της συνολικής χλωροφύλλης, σε ποσοστό ανάλογο με το επίπεδο στρες, με την αναλογία Chla/Chlb να σημειώνει αύξηση ανάλογη με το επίπεδο στρες (Zengin and Omer., 2005). Σύμφωνα με αναφορές, η έκθεση φυτών σε οδηγεί σε εκφυλισμό της χλωροφύλλης (Linger et al., 2005). Στην παρούσα μελέτη, εξαίρεση στην παρατηρηθείσα τάση μείωσης της χλωροφύλλης έπειτα από καταπόνηση με Cd αποτέλεσαν οι ποικιλίες Latuga Grandi-Loghi Brasiliana και Red Batavia, οι οποίες εμφάνισαν μια τάση αύξησης της χλωροφύλλης σε όλα τα επίπεδα καταπόνησης. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν πρόσθετες ενδείξεις για την ανθεκτικότητα των εν λόγω ποικιλιών, ανθεκτικότητα η οποία διαφάνηκε και κατά την *in vitro* αξιολόγηση στη φάση της βλάστησης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν έπειτα από εκχύλιση και μέτρηση φθορισμού της χλωροφύλλης, οι ποικιλίες διαφοροποιήθηκαν σημαντικά ως προς το προφίλ απόκρισης τους στην καταπόνηση, με ορισμένες ποικιλίες να εμφανίζουν τάση μείωσης και άλλες τάση αύξησης της χλωροφύλλης η οποία ήταν ανάλογη με τα αυξανόμενα επίπεδα στρες. Ειδικότερα, οι ποικιλίες Lattuga Grandi-Loghi Brasiliana και Red Batavia, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές στη φάση της βλάστησης, παρουσίασαν τάση μείωσης και αύξησης της περιεχόμενης χλωροφύλλης, αντίστοιχα. Μείωση επίσης παρατηρήθηκε και στις ποικιλίες που κατά τη φάση της βλάστησης χαρακτηρίστηκαν ως μέτριας ανθεκτικότητας ενώ αντίθετα, οι χαρακτηρισμένοι ως ευαίσθητοι γονότυποι εμφάνισαν αύξηση της χλωροφύλλης ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης Cd, η οποία πιθανώς αντανάκλα ένα μηχανισμό προσαρμογής προκειμένου να αντισταθμιστούν οι επιπτώσεις της τοξικότητας Cd. Σύμφωνα με αναφορές σε φυτά τομάτας, η καταπόνηση με Cd οδηγεί σε σημαντική μείωση των Chla, Chlb και καροτενοειδών, μείωση που είναι ανάλογη με την συγκέντρωση Cd (Cherif et al., 2010) .

Αναφορικά με τους γονότυπους που χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί έναντι της τοξικότητας Cd στη φάση της βλάστησης, η ποικιλία Latuga Grandi-Loghi Brasilliana ανήκει στον τύπο Iceberg ενώ η Red Batavia στον τύπο Looseleaf. Η ανθεκτικότητα της ποικιλίας κόκκινου μαρουλιού Red Batavia, πιθανώς σχετίζεται με το γεγονός ότι κατέχει υψηλή περιεκτικότητα σε φαιολικές ενώσεις (Kim et al., 2016; Yang et al., 2018), οι οποίες συνιστούν φυσικούς χηλικούς μεταλλικούς παράγοντες που δημιουργούν σύμπλοκα με τα τοξικά μέταλλα (Ahmed et al., 2013; Emamverdian et al., 2015; Jibril et al., 2017). Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι ποικιλίες Red Batavia και Geo store Manchester, που ανήκουν στον ίδιο τύπο μαρουλιού (looseleaf), εμφάνισαν διαφορετικό προφίλ απόκρισης την καταπόνηση Cd. Οι παρατηρηθείσες διαφορές σε επίπεδο ανθεκτικότητας ωστόσο μπορεί να αποδοθούν σε αντίστοιχες διαφορές στην έκφραση της κόκκινης χρωστικής, οι οποίες συνδέονται τόσο με την περιεκτικότητα σε φαιολικά οξέα όσο και με το ρυθμό επίδρασής τους (Pérez-López et al., 2014).

Κατά τη συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn (Cd:100 μ M-Zn: 10mM), ο Zn φάνηκε να επιδρά θετικά έναντι της τοξικότητας Cd κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, καθώς οδήγησε σε βελτιωμένη ανάπτυξη των σπορόφυτων συγκριτικά με τις επεμβάσεις καταπόνησης Cd. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μία αύξηση του μήκους ρίζας και βλαστού έπειτα από την έκθεση των φυτών στην καταπόνηση Cd-Zn στην πλειονότητα των υπό μελέτη ποικιλιών, καθώς οι τιμές του

μήκους ρίζας και βλαστού υπερείχαν των αντίστοιχων στο μεσαίο επίπεδο στρες Cd (100 μ M) και υπήρξαν ανάλογες με αυτές στο χαμηλό επίπεδο στρες Cd (50 μ M). Ανάλογες μελέτες σε φυτά τομάτας καταδεικνύουν τη θετική επίδραση του Zn έναντι της τοξικότητας Cd στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών (Cherif et al., 2011). Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς αποδίδονται στο γεγονός ότι το Cd και ο Zn, εξαιτίας της χημικής τους ομοιότητας, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με αποτέλεσμα να έχουν ανταγωνιστική δράση. Ως προς την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας των φυτών μαρουλιού σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, ο Zn φάνηκε να διαδραματίζει διττό ρόλο. Σε ορισμένες μεταβλητές, όπως αυτή του χλωρού βάρους, ο Zn δεν φάνηκε να ασκεί σημαντική επίδραση καθώς σημειώθηκαν τιμές ανάλογες με τις αντίστοιχες των φυτών στο μεσαίο επίπεδο στρες Cd (100 μ M). Αντίθετα, ως προς τη μεταβλητή του ξηρού βάρους, ο Zn επέδρασε θετικά, μειώνοντας την τοξικότητα Cd. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn, οι ανθεκτικές ποικιλίες εμφάνισαν τιμές ξηρού βάρους ανάλογες με αυτές των μαρτύρων, ενώ οι μέτριας ανθεκτικότητας και ευαίσθητες ποικιλίες εμφάνισαν τιμές όμοιες και μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες στο μεσαίο επίπεδο στρες Cd (100 μ M). Η θετική επίδραση του Zn έχει επίσης αναφερθεί σε προηγούμενες έρευνες που αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση Cd στα φύλλα φυτών μαρουλιού και σπανακιού μειώνεται εκθετικά με την αύξηση της συγκέντρωσης Zn (Mckenna et al., 1993). Παράλληλα, αναφέρεται η ανασταλτική δράση του Zn έναντι της συγκέντρωσης Cd, απουσία ωστόσο θετικής επίδρασης στη βλαστική και η ριζική βιομάζα (Mohammad and Moheman, 2010). Είναι αξιοσημείωτο ότι, σύμφωνα με τους Antoniadis et al. (2015), η ανταγωνιστική δράση μεταξύ Cd-Zn πιθανώς σχετίζεται με βραδύτερη απορρόφηση του Cd, λόγω ύπαρξης άλλων μετάλλων όπως ο Zn. Επίσης, θετική ήταν η επίδραση του Zn, καθώς τα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία εμφάνισαν ή μεγαλύτερες τιμές χλωροφύλλης συγκριτικά με τους μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων ερευνών, όπου αναφέρεται ότι η συνδυασμένη δράση Cd-Zn οδήγησε σε αποκατάσταση των επιπέδων χλωροφύλλης και χρωστικών (Cherif et al., 2011).

Η αναγνώριση και έπειτα η βελτίωση του γνωρίσματος της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας έναντι καταπονήσεων αποτελεί μια εξαιρετικά δύσκολη και χρονοβόρα διαδικασία, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ύπαρξη κατάλληλων μεθόδων επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων. Παραδοσιακά, η αξιολόγηση και επιλογή λαμβάνει χώρα σε πειραματικούς αγρούς κατά τα κρίσιμα αναπτυξιακά στάδια για την καταπόνηση και την καλλιέργεια. Είναι σημαντικό να τονιστεί ωστόσο ότι η διαδικασία επιλογής στον αγρό ελοχεύει αρκετούς κινδύνους και δυσκολίες

που έγκεινται στην i) αλληλεπίδραση του γονότυπου με το περιβάλλον (GxE), ii) στην αδυναμία επίτευξης ομοιόμορφων συνθηκών καταπόνησης σε συνθήκες αγρού iii) στην αναγκαιότητα αξιολόγησης μεγάλου αριθμού γονοτύπων προς επιλογή των κατά περίπτωση επιθυμητών γονοτύπων και iv) στην ταυτόχρονη επικράτηση ποικίλων παραγόντων καταπόνησης πέραν της υπό μελέτη καταπόνησης. για τους ανωτέρω λόγους, καθίσταται απαραίτητη η επιλογή ή/και δημιουργία αξιόπιστων μεθόδων αξιολόγησης και επιλογής επιθυμητών (ανθεκτικών) γονοτύπων.

Δεδομένου ότι η βλάστηση αποτελεί ένα από τα πλέον σημαντικά και κρίσιμα στάδια για την επιτυχή εγκατάσταση των καλλιεργειών και την επίτευξη ικανοποιητικής ανάπτυξης και απόδοσης, η αξιολόγηση υπό συνθήκες καταπόνησης κατά τη φάση αυτή έχει προταθεί ως αξιόπιστο κριτήριο επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων (Grzesiak et al., 1996; Aflaki et al., 2017). Παράλληλα, η προσέγγιση αυτή προσφέρει το πλεονέκτημα αξιολόγησης και επιλογής σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, γεγονός που επιτρέπει τη σημαντική επιτάχυνση και αναβάθμιση της βελτιωτικής διαδικασίας. Ωστόσο, η αξιοπιστία των πρώιμων επιλογών προϋποθέτει τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την αξιολόγηση του υπό μελέτη γενετικού υλικού, μέσω της εκατοστιαίας απώλειας της απόδοσης και άλλων σημαντικών γνωρισμάτων, σε συνθήκες καταπόνησης σε μεταγενέστερα, κρίσιμα για την καταπόνηση, αναπτυξιακά στάδια. Στο πλαίσιο αυτό, τα συνολικά ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν σημαντικές ενδείξεις για ικανοποιητική συσχέτιση της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας του μαρουλιού σε καταπόνηση από βαρέα μέταλλα στη φάση της βλάστησης και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Η διαπίστωση αυτή τεκμαίρεται από το γεγονός ότι η αξιολόγηση των υπό μελέτη των ποικιλιών στη φάση της βλάστησης επέτρεψε τη διάκριση της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας, ενώ παράλληλα επέτρεψε την κατηγοριοποίησή τους σε ανθεκτικές, μέτριας ανθεκτικότητας και ευαίσθητες. Παράλληλα, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η εγκυρότητα και αξιοπιστία της πρώιμης αξιολόγησης επιβεβαιώθηκε μέσω της απόκρισης των ποικιλιών και στα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, υπογραμμίζοντας έτσι τη δυνατότητα διενέργειας πρώιμων επιλογών επιθυμητών γονοτύπων στη φάση της βλάστησης. Η πρώιμη επιλογή επιθυμητών γονοτύπων σε συνθήκες *in vitro* παρέχει τη δυνατότητα αξιολόγησης και επιλογής μεγάλου αριθμού γονοτύπων σε σύντομο χρονικό διάστημα και με χαμηλό κόστος, ενώ παράλληλα η αξιολόγηση λαμβάνει χώρα σε ελεγχόμενες συνθήκες και απουσία πρόσθετων παραγόντων καταπόνησης.

Πέραν των διαδικασιών κλασικής βελτίωσης και επιλογής των επιθυμητών γονοτύπων, οι τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής προσφέρουν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης γονιδίων τα οποία εμπλέκονται και στοχεύουν σε μοριακά μονοπάτια άμυνας ή επάγουν την παραγωγή πρωτεϊνών ή δευτερογενών μεταβολιτών που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο για την άμυνα έναντι καταπονήσεων. Προς την κατεύθυνση αυτή, οι φυτοχηλατίνες, που συνιστούν ομάδες πεπτιδίων πλούσιες σε θειόλη, έχουν αξιοποιηθεί για την αποτοξίνωση από τα βαρέα μέταλλα. Ειδικότερα, γονίδια που κωδικοποιούν τη συνθετάση της φυτοχελατίνης συμβάλουν καθοριστικά στην αποτοξίνωση από βαρέα μέταλλα αλλά και στη μείωση των επιπτώσεων της οξειδωτικής καταπόνησης. Στο πλαίσιο αυτό, η ενσωμάτωση του γονιδίου *TaPCS1*, που προέρχεται από το σιτάρι, στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* οδήγησε σε αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι του Cd, και συγκεκριμένα αποδείχτηκε ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *TaPCS1* οδηγεί σε αύξηση της ανθεκτικότητας στο Cd κατά 15 φορές, συγκριτικά με τους μάρτυρες (Clemmens et al., 1999). Παράλληλα, η ενσωμάτωση του γονιδίου *TaPCS1* σε φυτά καπνού προσέδωσε δυνατότητα υπερ-συσσώρευσης βαρέων μετάλλων και αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι του Cd, χωρίς επακόλουθη μείωση της φυτικής βιομάζας (Martinez et al., 2006). Μία πρόσθετη γονιδιακή ομάδα που αξιοποιείται για την άμυνα έναντι της τοξικότητας βαρέων μετάλλων είναι αυτή της οικογένειας GST (γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης). Οι GSTs είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο κυτοσόλιο και η παραγωγή τους οφείλεται στην έκφραση των γονιδίων *gst* που επάγονται έπειτα από αβιοτικά ή/και βιοτικά ερεθίσματα. Οι GSTs είναι πρωτεΐνες αποτοξινωτικής δράσης καθώς έχουν την ικανότητα κατάλυσης της σύζευξης της γλουταθειόνης (GSH) και μετατροπής σε υποστρώματα ξеноβιοτικών ουσιών, προσφέροντας έτσι τη δυνατότητα απομόνωσης και αδρανοποίησης των τελευταίων στα κενοτόπια (Sappl et al., 2009). Η αξιοποίηση της συγκεκριμένης γονιδιακής ομάδας μπορεί να αποτελέσει μία πολύτιμη προσέγγιση για τη δημιουργία γενετικού υλικού με δράση υπερ-συσσωρευτή βαρέων μετάλλων για την αποκατάσταση ρυπασμένων από βαρέα μέταλλα εδαφών και υδροφόρου ορίζοντα.

5. Συμπεράσματα

- Κατά την *in vitro* αξιολόγηση των γονοτύπων μαρουλιού στη φάση της βλάστησης, οι επεμβάσεις καταπόνησης δεν επηρέασαν σημαντικά το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και συνεπώς κρίνεται ότι δεν αποτελεί αξιόπιστο κριτήριο για την ευχερή διάκριση της γενετικής ανθεκτικότητας/ευαισθησίας.
- Κατά τη φάση της βλάστησης, ιδιαίτερα σημαντική υπήρξε η επίδραση της τοξικότητας των μετάλλων στην ανάπτυξη των νεαρών σποροφύτων και συγκεκριμένα στο μήκος ρίζας και βλαστού, όπου σημειώθηκε μείωση του μήκους ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης Cd. Παράλληλα, η ευαισθησία στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης Cd κατά τη φάση αυτή συνοδεύτηκε και από ανάπτυξη συμπτωμάτων καταπόνησης, όπως αποχρωματισμός και καφέτιασμα της ρίζας.
- Η αξιολόγηση κατά τη φάση της βλάστησης επέτρεψε τη διάκριση της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και επιπρόσθετα επέτρεψε την κατηγοριοποίηση των υπό μελέτη γονοτύπων σε ανθεκτικούς, μέτριας ανθεκτικότητας και ευαίσθητους.
- Στα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, η γονοτυπική αξιολόγηση κατέδειξε ότι η τοξικότητα Cd επηρέασε σημαντικά το πλείστο των μεταβλητών που αξιοποιήθηκαν ως κριτήρια αξιολόγησης, με την επίδραση της καταπόνησης να είναι γενικά ανάλογη με την έντασή της. Μεταξύ των μεταβλητών που αξιοποιήθηκαν, το χλωρό και ξηρό βάρος των φυτών επέτρεψαν την διάκριση της ανθεκτικότητας και ευαισθησίας στο σύνολο των υπό μελέτη γονοτύπων, ενώ η χλωροφύλλη επίσης αναδείχθηκε ως κατάλληλο κριτήριο αξιολόγησης στο πλείστο των περιπτώσεων. Αντίθετα, το ύψος των φυτών δε διέφερε, συγκριτικά με τους μάρτυρες, σε κανένα από τα υπό μελέτη επίπεδα καταπόνησης και συνεπώς εκτιμάται ότι δεν αποτελεί αξιόπιστο κριτήριο επιλογής.
- Η συνδυασμένη καταπόνηση Cd-Zn άσκησε διαφορετική επίδραση στις υπό μελέτη μεταβλητές. Στη φάση της βλάστησης, ο Zn φάνηκε να επιδρά θετικά έναντι της τοξικότητας Cd, καθώς οδήγησε σε βελτιωμένη ανάπτυξη των σποροφύτων συγκριτικά με τις επεμβάσεις καταπόνησης Cd. Στα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, ο Zn επηρέασε θετικά το ξηρό

βάρος και την περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη, ενώ δε φάνηκε να ασκεί σημαντική επίδραση στο χλωρό βάρος των φυτών.

- Αναφορικά με το φαινότυπο, τα καταπονημένα φυτά δεν εμφάνισαν συμπτώματα καταπόνησης. Η παρατηρηθείσα ανεκτικότητα, ως προς την εκδήλωση συμπτωμάτων καταπόνησης, είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς συνδέεται με αδυναμία ανίχνευσης της τοξικότητας από βαρέα μέταλλα και αναγνώρισης των φυτών που πιθανώς έχουν συσσωρεύσει μεγάλες ποσότητες τοξικών μετάλλων.
- Παρά το γεγονός ότι επίδραση του Cd υπήρξε δυσμενής στα φυτά μαρουλιού, τον κυριότερο ρόλο διαδραμάτισε η διαφορετική εφαρμογή δόσης, γεγονός που συνηγορεί στο συμπέρασμα ότι η επίδραση της καταπόνησης παρουσιάζει ποσοτική και όχι ποιοτική τάση.
- Στο σύνολό τους, τα ευρήματα της μελέτης παρέχουν ενδείξεις για ικανοποιητική συσχέτιση της ανθεκτικότητας κατά τη φάση της βλάστησης και τα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια και υπογραμμίζουν τη δυνατότητα πρώιμης επιλογής ανθεκτικών γονοτύπων. Η προτεινόμενη προσέγγιση αναμένεται να συμβάλει προς την ουσιαστική επιτάχυνση και αναβάθμιση των διαδικασιών βελτίωσης του γνωρίσματος της ανθεκτικότητας σε περίσσεια βαρέων μετάλλων.

6. Βιβλιογραφία

Ξένη Βιβλιογραφία

1. Achakzai, Abdul Kabir Khan, Zahoor Ahmed Bazai, and Safdar Ali Kayani. "Accumulation of heavy metals by lettuce (*Lactuca sativa* L.) irrigated with different levels of wastewater of Quetta city." *Pak. J. Bot* 43.6 (2011): 2953.
2. Aflaki, Fatemeh, et al. "Investigation of seed germination indices for early selection of salinity tolerant genotypes: A case study in wheat." *Emirates Journal of Food and Agriculture* (2017): 222-226.
3. Ahmad, Iftikhar, et al. "Effect of cadmium on seed germination and seedling growth of four wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars." *Pak. J. Bot* 44.5 (2012): 1569-1574.
4. Ahmed, Hassanein Raifa, et al. "Soil contamination with heavy metals and its effect on growth, yield and physiological responses of vegetable crop plants (Turnip and Lettuce)." *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 9.4 (2013).
5. Akhter, Fardausi. "Cadmium accumulation and distribution in lettuce and barley." (2012).
6. Alves, Letícia Rodrigues, et al. "Cadmium stress related to root-to-shoot communication depends on ethylene and auxin in tomato plants." *Environmental and Experimental Botany* 134 (2017): 102-115.
7. Antoniadis, Vasileios, Sophia Papatheodorou, and Efi Levizou. "ZINC AND CADMIUM EFFECT IN LETTUCE, PURSLANE AND GERANIUM: METAL TRANSFER COEFFICIENTS." 2015.
8. Antoniadis, Vasileios, et al. "Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review." *Earth-Science Reviews* 171 (2017): 621-645.
9. Azevedo, Ricardo A., et al. "What is new in the research on cadmium-induced stress in plants?." *Food and Energy Security* 1.2 (2012): 133-140.
10. Bagheri, Rita, et al. "Effects of cadmium stress on plants." *Environmental sustainability: concepts, principles, evidences and innovations* (2014): 271-277
11. Bautista, Oscar V., Gerhard Fischer, and Julián F. Cárdenas. "Cadmium and chromium effects on seed germination and root elongation in lettuce, spinach and Swiss chard." *Agronomía Colombiana* 31.1 (2013): 48-57.

12. Benzarti, Saoussen, Shino Mohri, and Yoshiro Ono. "Plant response to heavy metal toxicity: comparative study between the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (ecotype Ganges) and nonaccumulator plants: lettuce, radish, and alfalfa." *Environmental Toxicology: An International Journal* 23.5 (2008): 607-616.
13. Cherif, Jaouhra, et al. "Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants(*Solanum lycopersicum*)." *Journal of Environmental Sciences(China)* 23.5 (2011): 837-844.
14. Clemens, Stephan, et al. "Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatins synthases from plants and yeast." *The EMBO journal* 18.12 (1999): 3325-3333.
15. Cramer, Grant R., et al. "Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective." *BMC plant biology* 11.1 (2011): 163.
16. DalCorso, Giovanni, Silvia Farinati, and Antonella Furini. "Regulatory networks of cadmium stress in plants." *Plant Signaling & Behavior* 5.6 (2010): 663-667.
17. De Vries, I. M. "Origin and domestication of *Lactuca sativa* L." *Genetic Resources and Crop Evolution* 44.2 (1997): 165-174.
18. Duque, Ana Sofia, et al. "Abiotic stress responses in plants: unraveling the complexity of genes and networks to survive." *Abiotic stress-plant responses and applications in agriculture*. InTech, 2013.
19. Emamverdian, Abolghassem, et al. "Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response." *The Scientific World Journal* 2015 (2015).
20. Ewais, E. A. "Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds." *Biologia Plantarum* 39.3 (1997): 403-410.
21. Fargašová, A. "Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots." *Biologia plantarum* 44.3 (2001): 471-473.
22. Farooqi, Z. R., et al. "Toxic effects of lead and cadmium on germination and seedling growth of *Albizia lebbek* (L.) Benth." *Pak. J. Bot* 41.1 (2009): 27-33.
23. Gill, Sarvajeet Singh, and Narendra Tuteja. "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants." *Plant physiology and biochemistry* 48.12 (2010): 909-930.
24. Gill, Sarvajeet Singh, and Narendra Tuteja. "Cadmium stress tolerance in crop plants: probing the role of sulfur." *Plant Signaling & Behavior* 6.2 (2011): 215-222.

25. Gill, Mukti. "Heavy metal stress in plants: a review." *Int J Adv Res* 2.6 (2014): 1043-1055.
26. Gilliam, Matthew, Jason A. Able, and Stuart J. Roy. "Translating knowledge about abiotic stress tolerance to breeding programmes." *The Plant Journal* 90.5 (2017): 898-917.
27. Gong, Yin, Liqun Rao, and Diqu Yu. "Abiotic stress in plants." *Agricultural Chemistry*. InTech, 2013.
28. Grzesiak, S., et al. "Screening for drought tolerance: evaluation of seed germination and seedling growth for drought resistance in legume plants." *Journal of Agronomy and Crop Science* 177.4 (1996): 245-252.
29. Hall, J. L. "Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance." *Journal of experimental botany* 53.366 (2002): 1-11.
30. Hirayama, Takashi, and Kazuo Shinozaki. "Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future." *The Plant Journal* 61.6 (2010): 1041-1052.
31. Jalmi, Siddhi K., et al. "Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling." *Frontiers in plant science* 9 (2018): 12.
32. Jibril, Sani Ahmad, et al. "Cadmium Toxicity Affects Phytochemicals and Nutrient Elements Composition of Lettuce (*Lactuca sativa* L.)." *Advances in Agriculture* 2017 (2017).
33. Kabata-Pendias, Alina, and Arun B. Mukherjee. *Trace elements from soil to human*. Springer Science & Business Media, (2007): 1-84.
34. Kim, Moo Jung, et al. "Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.)." *Journal of Food Composition and Analysis* 49 (2016): 19-34.
35. Lagriffoul, Arnoud, et al. "Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.)." *Plant and soil* 200.2 (1998): 241-250.
36. Lindqvist, K. "On the origin of cultivated lettuce." *Hereditas* 46.3-4 (1960): 319-350.
37. Linger, P., A. Ostwald, and J. Haensler. "Cannabis sativa L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis." *Biologia plantarum* 49.4 (2005): 567-576.
38. Lucini, Luigi, and Letizia Bernardo. "Comparison of proteome response to saline and zinc stress in lettuce." *Frontiers in plant science* 6 (2015): 240.

39. Martínez, Mar, et al. "An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils." *Chemosphere* 64.3 (2006): 478-485.
40. Matraszek, Renata, et al. "Macroelemental composition of cadmium stressed lettuce plants grown under conditions of intensive sulphur nutrition." *Journal of environmental management* 180 (2016): 24-34.
41. McKenna, Ilda Melo, Rufus L. Chaney, and Frederick M. Williams. "The effects of cadmium and zinc interactions on the accumulation and tissue distribution of zinc and cadmium in lettuce and spinach." *Environmental Pollution* 79.2 (1993): 113-120.
42. Mohammad, Ali, and Abdul Moheman. "The effects of cadmium and zinc interactions on the accumulation and tissue distribution of cadmium and zinc in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)." *Archives of Agronomy and Soil Science* 56.5 (2010): 551-561.
43. Monteiro, M. S., et al. "Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce." *Ecotoxicology and Environmental safety* 72.3 (2009): 811-818.
44. Onder, S., et al. "Determination of Heavy Metal Pollution in Grass and Soil of City Centre Green Areas (Konya, Turkey)." *Polish Journal of Environmental Studies* 16.1 (2007).
45. Pereira, Bruno Fernando Faria, et al. "Cadmium availability and accumulation by lettuce and rice." *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 35.2 (2011): 645-654.
46. Pérez-López, Usue, et al. "Phenolic composition and related antioxidant properties in differently colored lettuces: a study by electron paramagnetic resonance (EPR) kinetics." *Journal of agricultural and food chemistry* 62.49 (2014): 12001-12007.
47. Sappl, Pia G., et al. "The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress." *The Plant Journal* 58.1 (2009): 53-68.
48. Schutzendubel, Andres, and Andrea Polle. "Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization." *Journal of experimental botany* 53.372 (2002): 1351-1365.
49. Shafiq, Muhammad, M. Zafar Iqbal, and Athar Mohammad. "Effect of lead and cadmium on germination and seedling growth of *Leucaena leucocephala*." *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 12.3 (2008).

50. Shah, Labiba Riyaz, Mohit Husain, and Azeem Raja. "Abiotic stress mechanism in herbaceous crops: An overview." (2017).
51. Shahid, Muhammad, et al. "Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants." *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 232*. Springer, Cham, 2014. 1-44.
52. Shaw, Jonathan. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. CRC Press, (1989): 195-214.
53. Singh, S., et al. "Heavy metals accumulation and distribution pattern in different vegetable crops." *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 4.4 (2012): 75-81.
54. Suzuki, Nobuhiro, et al. "Abiotic and biotic stress combinations." *New Phytologist* 203.1 (2014): 32-43.
55. Trewavas, Anthony. "Aspects of plant intelligence." *Annals of botany* 92.1 (2003): 1-20.
56. Wang, Wangxia, Basia Vinocur, and Arie Altman. "Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance." *Planta* 218.1 (2003): 1-14.
57. Yang, Zhao, and Chengcai Chu. "Towards understanding plant response to heavy metal stress." *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*. InTech, 2011.
58. Yang, Xiao, et al. "A novel integrated non-targeted metabolomic analysis reveals significant metabolite variations between different lettuce (*Lactuca sativa*. L) varieties." *Horticulture research* 5.1 (2018): 33.
59. Yang, X., et al. "Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species." *Journal of Plant Nutrition* 19.3-4 (1996): 643-656.
60. Zengin, Fikriye Kirbag, and Omer Munzuroglu. "Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings." *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47.2 (2005): 157-164.
61. Zhou, Hang, et al. "Accumulation of heavy metals in vegetable species planted in contaminated soils and the health risk assessment." *International journal of environmental research and public health* 13.3 (2016): 289.
62. Zohary, Daniel. "The wild genetic resources of cultivated lettuce (*Lactuca sativa* L.)." *Euphytica* 53.1 (1991): 31-35.

Ελληνική Βιβλιογραφία

63. Ολύμπιος, Χ. Μ. "Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια." *Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα*, (2001): 39-40.
64. Πάσσαμ, Χάρολντ. " Σποροπαραγωγή Κηπευτικών. " Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, Αθήνα, (2013): 220-223.
65. Χα, Ιμπραχίμ-Αβραάμ, και Πετρόπουλος Σπύρος. " Γενική Λαχανοκομία και Υπάθρια Καλλιέργεια Λαχανικών". Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2014): 413-435.

